

**CUANTIFICACIÓN DE GENES DE MICROORGANISMOS AMONIA-  
OXIDANTES DEL SUELO A TRAVÉS DE PCR EN TIEMPO-REAL Y SU  
ASOCIACIÓN CON LA ACTIVIDAD DE LA INHIBICIÓN BIOLÓGICA DE LA  
NITRIFICACIÓN (BNI) EN *Brachiaria humidicola***

DANILO EDUARDO MORETA MEJÍA

UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA  
SANTIAGO DE CALI  
2010

**CUANTIFICACIÓN DE GENES DE MICROORGANISMOS AMONIA-  
OXIDANTES DEL SUELO A TRAVÉS DE PCR EN TIEMPO-REAL Y SU  
ASOCIACIÓN CON LA ACTIVIDAD DE LA INHIBICIÓN BIOLÓGICA DE LA  
NITRIFICACIÓN (BNI) EN *Brachiaria humidicola***

DANILO EDUARDO MORETA MEJÍA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Magíster  
en Ciencias-Biología

Director

Manabu Ishitani, Ph.D.

Co-Director

Nelson Toro, Ph.D.

UNIVERSIDAD DEL VALLE  
FACULTAD DE CIENCIAS  
PROGRAMA ACADÉMICO DE BIOLOGÍA  
SANTIAGO DE CALI  
2010

## Nota de Aprobación

El trabajo de grado titulado “Cuantificación de genes funcionales de microorganismos amonia-oxidantes del suelo a través de PCR en Tiempo-Real para estudiar la actividad de la Inhibición Biológica de la Nitrificación (BNI) en *Brachiaria humidicola*”, presentado por el estudiante DANILO EDUARDO MORETA MEJÍA, para optar al título de Magíster en Ciencias-Biología, fue revisado por el jurado y calificado como:

### Aprobado

---

Manabu Ishitani  
Director

---

Nelson Toro  
Co-Director

---

Enrique Peña  
Jurado

---

Idupulapati Rao  
Jurado

*“Todas las cosas son más simples de lo que piensas y al mismo tiempo más complejas de lo que imaginas.”*

*Goethe*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, a la vida, y a mi familia en general por ser los dones más sagrados que poseo.

Al Dr. Manabu Ishitani (CIAT) por la confianza que depositó en mí en el desarrollo de esta investigación, por darme la oportunidad de descubrirme aún más como profesional, y por su ejemplo de compromiso y dedicación.

Al Profesor Nelson Toro (Univalle) por su colaboración, tiempo, y paciencia.

Al Dr. Idupulapati Rao (CIAT) por su valioso aporte en la orientación de este estudio.

A la Ing. Alba Lucía Chávez (CIAT) por todo su apoyo en la realización de esta tesis.

A la consultora Myriam Cristina Duque (CIAT) por la camaradería y por su gran contribución en el análisis estadístico de los resultados de esta tesis.

A todo el personal del “Proyecto de Agrobiodiversidad y Biotecnología” y del “Proyecto Gramíneas y Leguminosas Tropicales” del CIAT por su disposición y ayuda oportuna.

A mis compañeros-amigos del Proyecto de Agrobiodiversidad y Biotecnología del CIAT por los momentos agradables y de los cuales aprendí una pizca de sabiduría pero a la vez una tonelada de humildad: Andrés Felipe Salcedo, Hugo Jaimes, Moralba Domínguez, Danilo López, Martín Rodríguez, Natalia Campillo, Adriana Alzate, y María del Pilar Hurtado.

A mi compañera cósmica, por su apoyo incondicional en todo momento.

Al CIAT y a la Universidad del Valle por su contribución en mi desarrollo personal y profesional.

## TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

ABSTRACT

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1 El género <i>Brachiaria</i>	7
2.2 <i>Brachiaria humidicola</i>	7
2.2.1 Taxonomía	7
2.2.2 Origen	8
2.2.3 Características agronómicas	8
2.2.4 Usos	9
2.3 Nitrificación y su papel en el ciclo del nitrógeno (N)	9
2.3.1 Nitrificación y la eficiencia del uso del nitrógeno (NUE) en los sistemas agrícolas	12
2.3.2 Nitrificación y sistemas de producción agrícolas presentes y futuros	13
2.3.3 Impactos positivos de la nitrificación en el ciclo del N	15
2.3.4 La materia orgánica del suelo (MOS) como fuente de $\text{NH}_4^+$ para la nitrificación	16
2.3.5 Preferencia de los cultivos de las formas de N	16
2.3.6 Bases teóricas de la nitrificación como presión selectiva en sistemas biológicos	17
2.3.7 Nitrificación y su impacto ambiental	18
2.3.8 Pérdidas de N asociadas con la nitrificación	18
2.3.8.1 Pérdidas de N gaseoso	19
2.3.8.2 Pérdidas de N por infiltración del $\text{NO}_3^-$	19
2.3.9 Impactos ambientales derivados de las pérdidas de N	20
2.3.9.1 Emisiones de NO y $\text{N}_2\text{O}$ y el calentamiento global	21
2.3.9.2 Contaminación con $\text{NO}_3^-$ y la eutricación	22
2.3.10 Factores que afectan la nitrificación	23
2.4 Posibles estrategias para la regulación de la nitrificación en sistemas agrícolas	24
2.4.1 Prácticas agrícolas	24
2.4.2 Inhibidores químicos sintéticos	24
2.5 Inhibición biológica de la nitrificación (BNI)	25
2.5.1 Modo de acción de los exudados de raíces como inhibidores de la nitrificación	26
2.5.2 Perspectivas para la regulación biológica de la nitrificación en sistemas agrícolas	28
2.5.3 Métodos de detección y cuantificación de los inhibidores de la nitrificación liberados en los sistemas planta-suelo	30
2.5.3.1 Ensayo de bioluminiscencia para detectar inhibidores de la	30

nitrificación liberados de las raíces: un estudio de caso con <i>Brachiaria humidicola</i>	
2.5.4 Métodos para estudiar y caracterizar el fenómeno BNI en el sistema planta-suelo	31
2.5.4.1 Determinación de tasa de oxidación del amonio	31
2.5.4.2 Medición de las emisiones de óxido nitroso	31
2.5.4.3 Estudio de la diversidad microbiana del suelo	32
2.5.4.3.1 Limitaciones principales	32
2.5.4.3.1.1 Heterogeneidad espacial	32
2.5.4.3.1.2 Incapacidad de cultivar microorganismos del suelo	32
2.5.4.3.2 Métodos para estudiar la diversidad microbiana del suelo	33
2.5.4.3.2.1 Conteo (plate counts)	33
2.5.4.3.2.2 Métodos basados en PCR	33
2.5.4.4 Cuantificación de microorganismos amonia-oxidantes del suelo	34
2.5.4.5 Aplicación de la PCR en Tiempo-Real para cuantificar microorganismos amonia-oxidantes del suelo	35
3. HIPÓTESIS	37
4. OBJETIVOS	38
4.1 General	
4.2 Específicos	
5. JUSTIFICACIÓN	39
6. MATERIALES Y MÉTODOS	43
6.1 Material vegetal	43
6.2 Validación en campo de la efectividad de <i>B. humidicola</i> en suprimir la nitrificación en el suelo y las emisiones de óxido nitroso (N <sub>2</sub> O)	44
6.3 Colecta de las muestras de suelo	47
6.4 Cuantificación de genes funcionales de microorganismos amonia-oxidantes del suelo a través de PCR en Tiempo-Real	48
6.4.1 Primers usados para la amplificación y cuantificación de los genes de interés	48
6.4.2 Extracción y cuantificación del DNA de suelo	50
6.4.3 Clonación de los genes de interés para la construcción de curvas estándar requeridas para la cuantificación de genes a través de PCR en Tiempo-Real	50
6.4.4 Genes de interés cuantificados a través de PCR en Tiempo-Real	52
6.4.5 Implementación y estandarización de metodología de la PCR en Tiempo-Real para determinar la actividad BNI en genotipos de <i>B. humidicola</i>	53
6.4.5.1 Determinación de la reproducibilidad, especificidad y confiabilidad de la PCR en Tiempo-Real para estudiar la actividad BNI en genotipos de <i>B. humidicola</i> a través de la cuantificación de genes a partir de DNA de suelo	53

6.5 Procesamiento de los datos	54
6.6 Análisis estadístico	55
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
7.1 Cuantificación de genes funcionales de microorganismos amonía-oxidantes del suelo a través de PCR en Tiempo-Real	56
7.1.1 Extracción y cuantificación del DNA de suelo	56
7.1.2 Clonación de los genes de interés para la construcción de curvas estándar requeridas para la cuantificación de genes a través de PCR en Tiempo-Real	57
7.1.3 Cuantificación de los genes de interés a través de PCR en Tiempo-Real para estudiar la actividad de la inhibición biológica de la nitrificación en <i>B. humidicola</i>	58
7.1.3.1 Implementación y estandarización de metodología de la PCR en Tiempo-Real para determinar la actividad BNI en genotipos de <i>B. humidicola</i>	58
7.1.3.1.1 Determinación de la reproducibilidad, especificidad, y confiabilidad de la PCR en Tiempo-Real para estudiar la actividad BNI en genotipos de <i>B. humidicola</i> a través de la cuantificación de genes a partir de DNA de suelo	59
7.1.3.2 Cuantificación de genes en el 4 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos	74
7.1.3.2.1 Cuantificación del gen SSU rRNA de bacteria y <i>amoA</i> de AOB en muestras de suelo colectadas en el 4 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a 30 días después de la fertilización con sulfato de amonio.	74
7.1.3.2.2 Cuantificación del gen SSU rRNA de archaea y <i>amoA</i> de AOA en muestras de suelo colectadas en el 4 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a 30 días después de la fertilización con sulfato de amonio	77
7.1.3.3 Cuantificación de genes en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos	79
7.1.3.3.1 Cuantificación del gen SSU rRNA de bacteria en muestras de suelo colectadas en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a un día después de la fertilización con sulfato de amonio	79
7.1.3.3.2 Cuantificación del gen <i>amoA</i> de AOB en muestras de suelo colectadas en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a un día después de la fertilización con sulfato de amonio	81
7.1.3.3.3 Cuantificación del gen SSU rRNA de archaea en muestras de suelo colectadas en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a un día después de la fertilización con sulfato de amonio	82



7.1.3.3.4	Cuantificación del gen <i>amoA</i> de AOA en muestras de suelo colectadas en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a un día después de la fertilización con sulfato de amonio	84
7.1.3.3.5	Efecto de la fertilización con sulfato de amonio en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a un día después de la fertilización	86
7.1.3.3.6	Cuantificación del gen SSU rRNA de bacteria y <i>amoA</i> de AOB en muestras de suelo colectadas en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a 30 días después de la fertilización con sulfato de amonio	89
7.1.3.3.7	Cuantificación del gen SSU rRNA de archaea en muestras de suelo colectadas en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a 30 días después de la fertilización con sulfato de amonio	91
7.1.3.3.8	Cuantificación del gen <i>amoA</i> de AOA en muestras de suelo colectadas en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a 30 días después de la fertilización con sulfato de amonio	92
8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS		96
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		99

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Variación en la actividad BNI de pastos de <i>Brachiaria</i> determinada a través del ensayo de bioluminiscencia usando exudados de raíces.	44
Tabla 2.	Secuencias y características de los primers utilizados para amplificar y cuantificar los genes <i>amoA</i> y SSU rRNA de bacteria y archaea a través de PCR en Tiempo-Real.	50
Tabla 3.	Datos promedio de C(t), eficiencias y número de copias del gen/reacción obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen <i>amoA</i> de AOB en dos muestras contrastantes de suelo a través de PCR en Tiempo-Real.	70
Tabla 4.	Datos promedio de C(t), eficiencias y número de copias del gen/reacción obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen SSU rRNA de bacteria en dos muestras contrastantes de suelo a través de PCR en Tiempo-Real.	70
Tabla 5.	Datos promedio de C(t), eficiencias y número de copias del gen/reacción obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen <i>amoA</i> de AOA en dos muestras contrastantes de suelo a través de PCR en Tiempo-Real.	71
Tabla 6.	Datos promedio de C(t), eficiencias y número de copias del gen/reacción obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen SSU rRNA de archaea en dos muestras contrastantes de suelo a través de PCR en Tiempo-Real.	71
Tabla 7.	Variación en el número de microorganismos del suelo en respuesta a la fertilización con sulfato de amonio al comparar el 4 <sup>to</sup> y 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a 30 días y un día después de la fertilización respectivamente	88

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo terrestre del nitrógeno (N)	12
Figura 2.	Mapa del diseño experimental del experimento en campo para validar la efectividad de <i>B. humificans</i> en suprimir la nitrificación en el suelo y las emisiones de óxido nitroso (N <sub>2</sub> O).	46
Figura 3.	Gel de calidad del DNA de suelo usado en los análisis moleculares.	56
Figura 4.	Visualización en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR de los genes de interés a ser clonados y usados en la construcción de curvas estándar para su cuantificación subsecuente a través de PCR en Tiempo-Real.	57
Figura 5.	Gráfica de fluorescencia de la curva estándar del gen <i>amoA</i> de <i>N. europaea</i> construida a partir de seis diluciones seriadas de pDNA y usada como referencia para cuantificar el número de copias del gen <i>amoA</i> de AOB en muestras de DNA de suelo.	60
Figura 6.	Gráfica de fluorescencia de la curva estándar del gen SSU rRNA de <i>E. coli</i> construida a partir de cuatro diluciones seriadas de pDNA y usada como referencia para cuantificar el número de copias del gen SSU rRNA de bacteria en muestras de DNA de suelo.	60
Figura 7.	Gráfica de fluorescencia de la curva estándar del gen <i>amoA</i> de AOA de suelo construida a partir de seis diluciones seriadas de pDNA y usada como referencia para cuantificar el número de copias del gen <i>amoA</i> de AOA en muestras de DNA de suelo.	61
Figura 8.	Gráfica de fluorescencia de la curva estándar del gen SSU rRNA de archaea de suelo construida a partir de siete diluciones seriadas de pDNA y usada como referencia para cuantificar el número de copias del gen SSU rRNA de archaea en muestras de DNA de suelo.	62
Figura 9.	Gráfica y modelo de regresión de la curva estándar generada a partir de cinco diluciones seriadas de pDNA (gen <i>amoA</i> de <i>N. europaea</i> ) para cuantificar el gen <i>amoA</i> en poblaciones de AOB del suelo.	63

Figura 10.	Gráfica y modelo de regresión de la curva estándar generada a partir de cinco diluciones seriadas de pDNA (gen SSU rRNA de <i>E. coli</i> ) para cuantificar el gen SSU rRNA en poblaciones de bacterias del suelo.	64
Figura 11.	Gráfica y modelo de regresión de la curva estándar generada a partir de seis diluciones seriadas de pDNA (gen <i>amoA</i> de AOA de suelo) para cuantificar el gen <i>amoA</i> en poblaciones de AOA del suelo.	65
Figura 12.	Gráfica y modelo de regresión de la curva estándar generada a partir de cuatro diluciones seriadas de pDNA (gen SSU rRNA de archaea de suelo) para cuantificar el gen SSU rRNA en poblaciones de archaea del suelo.	66
Figura 13.	Curva de disociación de la curva estándar y muestras de DNA de suelo usadas para cuantificar el número de copias del gen <i>amoA</i> en poblaciones de AOB a través de PCR en Tiempo-Real.	67
Figura 14.	Curva de disociación de la curva estándar y muestras de DNA de suelo usadas para cuantificar el número de copias del gen SSU rRNA en poblaciones de bacterias del suelo a través de PCR en Tiempo-Real.	67
Figura 15.	Curva de disociación de la curva estándar y muestras de DNA de suelo usadas para cuantificar el número de copias del gen <i>amoA</i> en poblaciones de AOA a través de PCR en Tiempo-Real.	68
Figura 16.	Curva de disociación de la curva estándar y muestras de DNA de suelo usadas para cuantificar el número de copias del gen SSU rRNA en poblaciones de archaea de suelo a través de PCR en Tiempo-Real.	69
Figura 17.	Reproducibilidad de la PCR en Tiempo-Real en términos de C(t) obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen <i>amoA</i> de AOB en dos muestras contrastantes de suelo.	72
Figura 18.	Reproducibilidad de la PCR en Tiempo-Real en términos de C(t) obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen SSU rRNA de bacteria en dos muestras contrastantes de suelo.	73
Figura 19.	Reproducibilidad de la PCR en Tiempo-Real en términos de C(t) obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen <i>amoA</i> de archaea en dos muestras contrastantes de suelo.	73
Figura 20.	Reproducibilidad de la PCR en Tiempo-Real en términos de C(t) obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen SSU	74

	rRNA de archaea en dos muestras contrastantes de suelo.	
Figura 21.	Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población de bacterias del suelo en el 4 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento a 30 días después de la fertilización al estimar el número de copias del gen SSU rRNA de bacteria y <i>amoA</i> de AOB a través de PCR en Tiempo-Real.	76
Figura 22.	Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población archaeas del suelo en el 4 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento a 30 días después de la fertilización al estimar el número de copias del gen SSU rRNA de archaea y <i>amoA</i> de AOA a través de PCR en Tiempo-Real.	79
Figura 23.	Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población de bacterias del suelo en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento a un día después de la fertilización al estimar el número de copias del gen SSU rRNA 16S de bacteria a través de PCR en Tiempo-Real.	80
Figura 24.	Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población de bacterias amonia-oxidantes (AOB) del suelo en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento a un días después de la fertilización al estimar el número de copias del gen <i>amoA</i> de AOB a través de PCR en Tiempo-Real.	82
Figura 25.	Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población de archaeas del suelo en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento a un días después de la fertilización al estimar el número de copias del gen SSU rRNA de archaea a través de PCR en Tiempo-Real.	84
Figura 26.	Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población de archaeas amonia-oxidantes (AOA) del suelo en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento a un día después de la fertilización al estimar el número de copias del gen <i>amoA</i> de AOA través de PCR en Tiempo-Real.	86
Figura 27.	Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población de bacterias del suelo en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento a	91

	30 días después de la fertilización al estimar el número de copias del gen SSU rRNA de bacteria y <i>amoA</i> de AOB a través de PCR en Tiempo-Real.	
Figura 28.	Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población archaeas del suelo en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento a 30 días después de la fertilización al estimar el número de copias del gen SSU rRNA de archaea a través de PCR en Tiempo-Real.	92
Figura 29.	Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población de archaeas amonia-oxidantes (AOA) del suelo en el 5 <sup>to</sup> ciclo de crecimiento a 30 días después de la fertilización al estimar el número de copias del gen <i>amoA</i> de AOA través de PCR en Tiempo-Real.	94

## RESUMEN

Las actividades antropocéntricas han impactado el ciclo del nitrógeno (N). El uso indiscriminado de fertilizantes nitrogenados en los sistemas de producción agrícola ha generado una influencia negativa en el ambiente ya que el 70% de los mismos se pierde debido a la nitrificación y a otros procesos asociados. La nitrificación es un proceso microbiológico que genera nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y promueve la pérdida de los fertilizantes nitrogenados por escorrentía. El proceso asociado con la nitrificación, la desnitrificación, genera óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) a través de la volatilización del N. Este hecho hace que la eficiencia del uso del nitrógeno (NUE) y el manejo de nutrientes representen un gran problema para la mayoría de cultivos en general. Ciertas plantas pueden suprimir la nitrificación en el suelo a través de la liberación de inhibidores presentes en los exudados de sus raíces. Este fenómeno se conoce como Inhibición Biológica de la Nitrificación (BNI). La regulación de la nitrificación podría ser una estrategia clave para mejorar el reciclamiento del N y la NUE agronómica de los cultivos. En este estudio se determinó y confirmó el efecto que ejercen los exudados de las raíces de *Brachiaria humidicola* en el número de genes funcionales amoníaco-oxigenasa (*amoA*) y genes de las subunidades pequeñas de los rRNAs ribosomales (SSU rRNA) en poblaciones de bacterias y archaeas del suelo involucradas en el proceso de la nitrificación.

El material vegetal se seleccionó con base en la habilidad de las raíces para inhibir la nitrificación (determinada a través del ensayo de bioluminiscencia y análisis químicos de muestras de suelo). Dicho material consistió de dos accesiones de *B.*

*humidicola*: CIAT 679, CIAT 16888; *Brachiaria híbrido* cv. Mulato, *Panicum maximum* cv. Común, soya cv. ICAP 34 (la cual favorece la nitrificación), y el control (suelo desnudo sin plantas). La unidad experimental consistió de una parcela de 10x10 m (100 m<sup>2</sup>). Se usó un diseño estadístico de bloques completos al azar (BCA) con tres repeticiones biológicas. El fertilizante se aplicó en forma de sulfato de amonio disuelto en agua en subparcelas de 1 m<sup>2</sup>. Las muestras de suelo se colectaron de las subparcelas a 30 días después de la fertilización con sulfato de amonio en el cuarto ciclo únicamente, y a 1 y 30 días después de la fertilización en el quinto ciclo de crecimiento del cultivo. La cuantificación de los genes de las bacterias y archaeas se hizo a partir de DNA de suelo a través de PCR en Tiempo-Real usando combinaciones de primers específicas. La curva estándar requerida para la PCR en Tiempo-Real se generó a partir de DNA de plásmido el cual contenía inserto el producto de PCR específico del gen de interés; a saber, gen de las subunidades pequeñas de los rRNAs ribosomales (SSU rRNA) de bacteria, gen *amoA* de bacterias amonia-oxidantes (AOB), gen las subunidades pequeñas de los rRNAs ribosomales (SSU rRNA) de archaea, y el gen *amoA* de archaeas amonia-oxidantes (AOA).

Los datos moleculares (expresados en número de copias del gen de interés / g de suelo seco) confirmaron que *B. humidicola* CIAT 16888 posee la habilidad de inhibir la nitrificación (actividad BNI) al observarse un menor número de copias de los genes *amoA* de AOB y AOA en las parcelas de este genotipo en comparación con los controles (soya y suelo desnudo) y los demás pastos tropicales. La población total de bacterias del suelo (expresada como número de copias del gen



SSU rRNA / g de suelo seco) no se vio afectada significativamente por los exudados de las raíces de *B. humidicola*. Esto sugiere la alta especificidad de tales exudados en la inhibición exclusiva de genes *amoA* de AOB principalmente.

Se confirmó que la aplicación de sulfato de amonio estimula la actividad BNI de *B. humidicola* ya que ésta causó un notable incremento del número de genes *amoA* de AOA y SSU rRNA de archaea en el 5<sup>to</sup> ciclo a un día después de la fertilización sin interferir en el efecto inhibitorio de los exudados de las raíces de esta especie. Se conducirán estudios futuros para caracterizar el fenómeno BNI en respuesta a varios factores ambientales y posteriormente identificar los genes que gobiernan la característica BNI para su uso en programas de fitomejoramiento de *Brachiaria* u otros cultivos.

## ABSTRACT

Human activities have profoundly influenced the nitrogen (N) cycle. The indiscriminate use of nitrogen fertilizers in agricultural systems has generated a negative impact on the environment since around 70% of these fertilizers are lost due to nitrification and associated processes. Nitrification is a microbiological process that generates nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and promotes the losses of nitrogen fertilizers by leaching. Denitrification, an associated process with nitrification, produces nitrous oxide ( $\text{N}_2\text{O}$ ) by nitrogen volatilization. This fact is a problem for the Nitrogen Use Efficiency (NUE) and nutrient management for most crops. Certain plants can suppress soil-nitrification by releasing inhibitors from roots; a phenomenon termed Biological Nitrification Inhibition (BNI). Regulation of nitrification could be a key strategy to improve N-recovery and agronomic NUE of crops. In this study, we determined and confirmed the effect of root exudates of *Brachiaria humidicola* on the copy number of *amoA* functional genes and Small-Subunit (SSU) ribosomal RNA (rRNA) genes in soil populations of bacteria (AOB) and archaea, which are involved in the nitrification process.

Vegetal material was selected based on the ability of the roots to inhibit nitrification (as determined by bioluminescence assay and soil chemical analyses). This material comprised two accessions of *B. humidicola*: CIAT 679, CIAT 16888; *Brachiaria híbrido* cv. Mulato, *Panicum maximum* cv. Común, soybean cv. ICAP 34 (which promotes nitrification), and bare soil as control (no plants). A plot of 10 x 10 m (100 m<sup>2</sup>) was used as the experimental unit. Three biological replications were

arranged in a statistical experimental design of randomized blocks (RB). Water-dissolved ammonium sulfate was applied as fertilizer into 1 m<sup>2</sup> subplots. Soil samples were collected from subplots at 1 day after fertilization in the 4<sup>th</sup> cycle only, and at 1 and 30 days after fertilization in the 5<sup>th</sup> growth cycle of the crops. Quantification of bacteria and archaea genes was performed from soil DNA through Real-Time PCR and using specific primer sets. Standard curve for quantification was constructed from plasmid DNA which contained the insert of the specific PCR product of the amplified target gene; i.e. bacteria Small-Subunit (SSU) ribosomal RNA (rRNA) gene, ammonia-oxidizing bacteria (AOB) *amoA* gene, archaea Small-Subunit (SSU) ribosomal RNA (rRNA) gene, and ammonia-oxidizing archaea (AOA) *amoA* gene.

Molecular data (expressed as gene copy number / g dry soil) confirmed that *B. humidicola* CIAT 16888 has the capacity of inhibiting nitrification (BNI activity). Soil of *B. humidicola* CIAT 16888 plots exhibited a lower gene copy number of AOB and AOA *amoA* genes compared to the controls (soybean and bare soil) and the other tropical grasses. Nevertheless, the total soil bacteria population (expressed as SSU rRNA gene copy number / g dry soil) was not significantly affected by the root exudates released from *B. humidicola*. This suggests the high specific nature of such root exudates to inhibit AOB *amoA* genes mainly.

It was also confirmed that the application of ammonium sulfate stimulates BNI activity in *B. humidicola* since it triggered an increase of the *amoA* gene copy number without impairing the inhibitory effect of the root exudates of this species.

Future efforts will be focused on the characterization of the BNI trait in response to several environmental factors. Subsequently, a research is needed to identify the genes that regulate the BNI trait. These genes could be exploited in breeding programs of either *Brachiaria* or other species.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las actividades humanas han influenciado profundamente el ciclo del nitrógeno (N). Actualmente, el uso global de fertilizantes nitrogenados ha alcanzado aproximadamente las 100 millones ton/año con el fin de mantener los niveles de producción agrícola (IFA, 2005). Aproximadamente el 70% de los fertilizantes nitrogenados usados en los sistemas de producción agrícolas se pierde debido a la nitrificación y a sus procesos asociados (Raun y Johnson, 1999; Glass, 2003). En suelos agrícolas altamente fertilizados e irrigados la pérdida de N en forma de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) a través de escorrentías puede alcanzar los 912 kg  $\text{NO}_3^-$  ha/año (Adriano *et al.*, 1972; Pratt y Adriano, 1973). Adicionalmente, la agricultura representa una fuente importante de generación de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), un poderoso gas de efecto invernadero, produciendo alrededor de 70% de las emisiones antropocéntricas totales (Mosier, 1993; Smith *et al.*, 1997). Se estima que las emisiones globales de  $\text{N}_2\text{O}$  producidas por áreas cultivadas es de 3.5 millones ton anuales, de las cuales 1.5 millones ton son directamente atribuidas al uso de fertilizantes nitrogenados sintéticos (Kroeze, 1994; Smith *et al.*, 1997). Por otra parte, los costos de los fertilizantes se están incrementando continuamente haciendo la producción agrícola mas costosa que en décadas pasadas.

Lograr la sincronía entre el suministro de N y la demanda de los cultivos sin causar exceso o deficiencia es la clave para optimizar la comercialización y el mercadeo considerando la productividad del cultivo, las ganancias o utilidades, y la calidad ambiental (Cassman, *et al.*, 2002). Tomando en consideración los sistemas de producción de cereales (trigo, maíz, arroz, cebada, sorgo, mijo, avena, y centeno)

la eficiencia del uso del nitrógeno (NUE) es aproximadamente 33%. El 67% restante representa pérdidas de los fertilizantes nitrogenados a través de escorrentías y volatilización (Raun *et al.*, 2002). Este hecho representa un gran problema en el manejo de nutrientes para la mayoría de cultivos en general.

Investigaciones intensivas relacionadas con NUE se han llevado a cabo en los últimos años a nivel fisiológico y molecular. Sin embargo, los mecanismos que gobiernan la adquisición y utilización del N en las plantas no han sido dilucidados en su totalidad debido a la complejidad de este proceso. Por lo tanto, los métodos convencionales para caracterizar agronómicamente genotipos que exhiben tasas altas de NUE deben complementarse con metodologías o estrategias novedosas. El fenómeno acuñado como inhibición biológica de la nitrificación (BNI) ofrece una vía alternativa para incrementar la NUE en los cultivos.

Uno de los mayores problemas de la producción agrícola moderna es la alta incidencia de contaminación por nitrógeno (N) y la baja eficiencia de utilización del mismo. El proceso microbiológico de la nitrificación del amonio- $\text{NH}_4^+$  a nitrato- $\text{NO}_3^-$  resulta en la transformación del relativamente inmóvil  $\text{NH}_4^+$  en el altamente móvil  $\text{NO}_3^-$ , que puede resultar en pérdidas significativas de N derivadas del proceso de desnitrificación, y escorrentía del  $\text{NO}_3^-$  (Subbarao *et al.*, 2006a). Este hecho resulta en la contaminación ambiental y en el uso ineficiente del N presente en forma natural en el suelo, y del N aplicado en forma de fertilizantes en los ecosistemas de producción de cultivos agrícolas (Raun y Johnson, 1999; Giles, 2005; Subbarao *et al.*, 2006a). La pérdida de N de la zona de la raíz tiene sustanciales

implicaciones económicas, representado pérdidas valoradas en 15 billones de dólares/año en pérdidas de fertilizantes solamente, más los costos no estimados de los impactos ambientales tales como contaminación con N de los acuíferos subterráneos, la eutricación de los cuerpos de agua superficiales, y la contaminación de la atmósfera (Raun y Johnson, 1999; Giles, 2005; Subbarao *et al.*, 2006a). Del mismo modo, se ha reportado la incidencia de cáncer de estómago en humanos, particularmente en infantes, y de linfoma no-Hodgkin (LNH) debido a la ingesta de agua contaminada con nitratos (Hill *et al.*, 1973; Weisenburger, 1991).

La nitrificación, un proceso microbiológico, es un componente clave y parte integral del ciclo del N. Durante la nitrificación, una forma relativamente inmóvil de N (amonio- $\text{NH}_4^+$ ) es convertido en el altamente móvil nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). El nitrato formado es susceptible a pérdidas vía infiltración y a conversión a formas gaseosas vía desnitrificación. A menudo, menos del 30% del N aplicado en forma de fertilizantes químicos es recuperado en sistemas agrícolas intensivos, debido mayormente a las pérdidas asociadas directa e indirectamente con el proceso de la nitrificación. La eficiencia del uso del N (NUE) se define como la biomasa producida por unidad de N asimilado y es una función conservativa en la mayoría de sistemas biológicos. La supresión de la nitrificación junto con sus pérdidas asociadas de N constituye potencialmente un componente clave en cualquier estrategia para mejorar la recuperación del N y la NUE agronómica. Por tal motivo, la supresión/inhibición de la nitrificación en ecosistemas agrícolas es un paso

crítico necesario para mejorar la NUE agronómica y mantener la calidad ambiental (Subbarao *et al.*, 2006a).

El concepto de plantas que liberan compuestos inhibitorios que suprimen la nitrificación en el suelo ya ha sido reportada (Lodhi, 1982; Bradley *et al.*, 1988; White 1988, 1991). Investigaciones recientes han mostrado que ciertos pastos tropicales tales como *Brachiaria humidicola* tienen la habilidad de liberar compuestos químicos de la raíz que inhiben o suprimen la nitrificación en el suelo, y este atributo ha sido nombrado inhibición biológica de la nitrificación (BNI) (Subbarao *et al.*, 2006b).

Estudios anteriores sugieren una alta variabilidad en la liberación de los compuestos-BNI a partir de las raíces de *B. humidicola*, indicando que la liberación de los compuestos-BNI se debe más probablemente a un atributo regulado que una característica cuantitativa. La actividad nitrificante y las tasas de crecimiento se incrementan gracias a la disponibilidad en el suelo de  $\text{NH}_4^+$  proveniente de los fertilizantes o liberado por la mineralización de la materia orgánica del suelo (Robinson, 1963; Woldendorp y Laanbroek, 1989). Si la característica BNI se ha desarrollado como un mecanismo adaptativo para conservar el N e incrementar el uso eficiente del mismo en los ecosistemas naturales, la liberación de los compuestos-BNI de las raíces se asocia probablemente con la disponibilidad de N en la zona de la rizósfera (Rao *et al.*, 1996).



Subbarao *et al.*, 2009 reportó el descubrimiento de un inhibidor eficiente de la nitrificación en los exudados de las raíces del pasto forrajero tropical *Brachiaria humidicola* (Rendle) Scheick. Este inhibidor fue nombrado como “brachialactona” y el mismo contribuyó con un 60 a 90% de la actividad inhibidora liberada de las raíces de este pasto tropical. “Brachialactona” probablemente afecta las dos rutas enzimáticas en *Nitrosomonas* (una bacteria amonia-oxidante implicada en el proceso de la nitrificación), i.e. AMO (amonia-monooxigenasa) y HAO (hidroxilamina oxidoreductasa). La liberación de este inhibidor es una función regulada inducida y mantenida por la disponibilidad de amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en el nicho radicular. La liberación de “Brachialactona” se restringe exclusivamente a las raíces que están directamente expuestas a amonio. En un experimento establecido por 3 años pastos de *Brachiaria* suprimieron las poblaciones nitrificantes del suelo [determinadas como número de genes *amoA* en bacterias amonia-oxidantes (AOB) y archaeas amonia-oxidantes (AOA)], junto con las tasas de nitrificación y las emisiones de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ). El proceso de investigación para determinar el número de genes en AOB y AOA se detalla en esta tesis.

Se cree que la filosofía actual de adición masiva de fertilizantes a los sistemas de producción agrícola a gran escala no representa un factor limitante; este hecho ha resultado en la aplicación desmedida de fertilizantes (especialmente N) sin tomar en consideración el impacto ambiental generado. Los excesos en la aplicación de N se realizan en parte para sostener sistemas de producción intensivos y así suplir las necesidades alimentarias mundiales. Estas aplicaciones excesivas de N

estimadas en 100 millones ton de N fijado industrialmente tiene muchas implicaciones ambientales en su mayoría debido a la nitrificación y las pérdidas de N asociadas con los sistemas de producción agrícolas. Es necesario, por lo tanto, desarrollar estrategias para el uso eficiente del N en la producción de cultivos que sean capaces de suplir los requerimientos de altos niveles de producción y además sean conscientes de los problemas ambientales actuales (Subbarao *et al.*, 2006a). Por consiguiente, la explotación de la función BNI podría convertirse en una novedosa estrategia para desarrollar sistemas agronómicos con tasa bajas de nitrificación, beneficiando tanto a la agricultura y al medio ambiente (Subbarao *et al.*, 2009).

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 El género *Brachiaria*

*Brachiaria* es el género de pastos forrajeros más extendido y cultivado en el trópico abarcando alrededor de 100 especies dispersadas principalmente en África (Miles *et al.*, 1996). El gran interés de tipo agronómico que despierta este género se basa en el hecho de que genera pasturas de gran calidad, aumentando la eficiencia en la producción de carne de ganado, principalmente el vacuno. Se dice que en Sudamérica cubre vastas regiones con más de 250 millones de hectáreas y con una proyección creciente. Brasil es el país de la región con la mayor cantidad de superficie sembrada (40 millones de hectáreas). En Colombia, actualmente *Brachiaria* es el género de gramíneas más cultivado por sus bondades agronómicas (Rivas y Holmann, 2004).

Las especies de *Brachiaria* que más han sido utilizadas para establecer pasturas debido a sus bondades agronómicas son: *B. decumbens* cv. Basilisk, *B. humidicola*, *B. brizantha*, y *B. ruziziensis* y últimamente el híbrido Mulato (un cruce entre *B. brizantha*, y *B. ruziziensis*).

### 2.2 *Brachiaria humidicola*

#### 2.2.1 Taxonomía

Clase: *Monocotyledoneae*

Orden: Poales

Familia: *Poaceae* (alt. *Gramineae*)

Subfamilia: *Panicoideae*

Tribu: *Paniceae*

Género: *Brachiaria* (Trin.) Griseb.

Especie: *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick

### 2.2.2 Origen

Según la escasa información que se tiene al respecto, *B. humidicola* es una planta introducida posiblemente de Zimbabwe (antigua Rodesia) y Kenia, África, donde también se conoce como *B. dictyoneura*, aunque según Bogdan (1977), *B. humidicola* es mucho más estolonífera y el número de cromosomas es  $2n=72$ , mientras que *B. dictyoneura* es más erecta y el número de cromosomas es  $2n=42$ .

### 2.2.3 Características agronómicas

Se trata de una planta perenne con tallos florales (hasta de 50 cm), estolonífera de hojas lanceoladas que tolera niveles altos de Al intercambiable y baja fertilidad natural; crece en suelos de pH 4.0-4.6 y también tolera muy bien la sombra. Una de las características que ha hecho muy popular esta especie, sobretodo en el trópico húmedo de Brasil, es su tolerancia a los insectos, especialmente el salivazo o mión (*Aeneolamia* sp., *Zulia* sp.) al cual es muy susceptible *B. decumbens*; además, por su hábito y vigor de crecimiento también compite muy bien con las malezas (Tergas, 1991).

Se han reportado producciones promedio anuales de materia seca entre 15-30 ton/ha, dependiendo de la fertilidad del suelo, pero casi siempre muestra una productividad superior a otras gramíneas, sobre todo en el segundo año de

establecimiento, en condiciones de suelos ácidos e infértiles en los cuales se aplica solamente alrededor de 50 Kg  $P_2O_5$ /ha. Por su tolerancia a la sequía, la producción de materia seca en la estación seca puede alcanzar el 30-40% de la producción total anual, según la duración e intensidad del período (Tergas, 1991).

#### **2.2.4 Usos**

*Brachiaria humidicola* es una especie de pasto muy productivo cultivado ampliamente en países tropicales húmedos de Sudamérica y otros países tropicales alrededor del mundo (Tergas, 1991). Su principal uso es como alimento para ganado (pastoreo) y como cultivo de cobertura para el control de la erosión y malezas.

A pesar de que se ha documentado que el pasto es bien consumido por los animales cuando no está maduro, se ha encontrado que la digestibilidad aparente de la materia seca es solamente del 50-58%. También se ha observado que cuando el pasto madura rápidamente, tanto en la estación seca como en la lluviosa, el pastoreo se vuelve bastante selectivo hacia las hojas jóvenes del rebrote tierno de la planta (Tergas, 1991).

### **2.3 Nitrificación y su papel en el ciclo del nitrógeno (N)**

La nitrificación junto con la fijación del N y la desnitrificación constituyen procesos importantes que han influenciado profundamente el ciclo terrestre del N (Figura 1). La nitrificación se lleva a cabo por dos grupos de bacterias quimio-litotróficas (*Nitrosomonas* sp. y *Nitrobacter* sp.), las cuales son componentes abundantes de

todas las poblaciones microbianas del suelo. Las bacterias nitrificantes poseen la habilidad de sobrevivir períodos largos en estado de dormancia (Belser, 1979). Otras especies de bacterias tales como *Nitrosocystus* y *Nitrosospira*, y algunos hongos heterotróficos tales como *Aspergillus flavus* también desempeñan un papel importante en algunos ecosistemas (Sommer *et al.*, 1976).

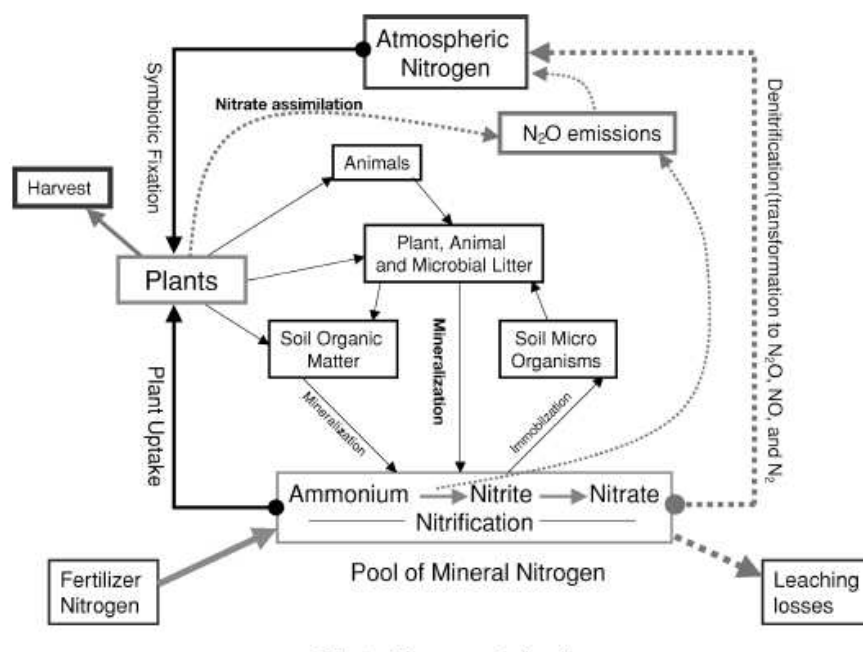
La oxidación biológica del  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  es conocida como “nitrificación” (Jarvis, 1996). El proceso de la nitrificación ofrece el mayor potencial (en el ciclo del N) para los cambios que podrían incrementar la eficiencia del uso del N. Solo al cambiar la forma de N a nitrato lo hace muy susceptible a ser desnitrificado o infiltrado a partir de la zona de la rizósfera. Este cambio también afecta en como el N es absorbido por las plantas y la forma del N que ingresa en el ciclo del N o se pierde al ambiente (Norton *et al.*, 2002) (Figura 1).

La nitrificación es llevada a cabo por dos grupos de bacterias (*Nitrosomonas sp.* y *Nitrobacter sp.*), las cuales hacen parte importante de las poblaciones microbianas del suelo (Belser, 1979). Últimamente se ha reportado que las archaeas amonía-oxidantes son más abundantes que las bacterias amonía-oxidantes, lo cual sugiere que las primeras pueden ser los microorganismos amonía-oxidantes más abundantes en los ecosistemas terrestres por lo que su implicación en el proceso de la nitrificación también podría ser importante (Leininger *et al.*, 2006).

El proceso de la nitrificación por lo general es más rápido en suelos con un  $\text{pH} \geq 6.0$ , pero más lento en suelos con un  $\text{pH} \leq 5.0$ . En condiciones ácidas, el

amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) se presenta principalmente como amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), de este modo no es apropiado como sustrato para la acción de la enzima amonia-monooxigenasa (Suzuki *et al.*, 1974). Microorganismos nitrificantes aislados de suelos ácidos no fueron capaces de realizar sus actividades nitrificantes en cultivos líquidos a un pH inferior a 5.5 (Prosser, 1989). No obstante, la nitrificación se desarrolla en suelos con  $\text{pH} \leq 4.0$  (Vitousek *et al.*, 1982). Varias teorías han sido propuestas para explicar la nitrificación en suelos ácidos incluyendo la existencia de cepas ácido-tolerantes, micrositios con niveles de pH relativamente superior, asociaciones sintrópicas con organismos mineralizadores, y protección vía formación de agregados (Kowalchuk y Stephen, 2001).

El catabolismo del amoníaco (por las bacterias amonia-oxidantes tales como *Nitrosomonas* sp.) se da en dos pasos. El amoníaco es inicialmente oxidado a hidroxilamina por acción de la enzima amonia monooxigenasa (AMO), enzima que contiene cobre y hace parte de una proteína de membrana (Basu *et al.*, 2003). La hidroxilamina es después oxidada a nitritos por acción de la enzima hidroxilamina oxidoreductasa (HAO). Esta oxidación libera cuatro electrones, dos de los cuales son devueltos a la enzima AMO para mantener la oxidación del amoníaco. Los dos electrones restantes quedan disponibles para suplir las necesidades reductoras de la célula (por ejemplo, la generación de NADPH), el cual es la única fuente de energía de estas bacterias litoautotróficas (Bock *et al.*, 1991).



**Figura 1.** Ciclo terrestre del nitrógeno (N).

Fuente: Subbarao *et al.*, 2006a.

### 2.3.1 Nitrificación y la eficiencia del uso del nitrógeno (NUE) en los sistemas agrícolas.

La conversión rápida de  $\text{NH}_4^+$  a  $\text{NO}_3^-$  en el suelo limita la efectividad de la mayor parte del N aplicado en forma de fertilizante. Alrededor del 90% de los fertilizantes nitrogenados se aplican al suelo en forma de  $\text{NH}_4^+$ , el cual es en su mayoría nitrificado dentro de cuatro semanas después de la aplicación (Sahrawat, 1980a). Para la mayoría de los suelos arables, la nitrificación es tan rápida y universal que las aplicaciones de  $\text{NH}_4^+$ -N generalmente pueden considerarse como casi equivalentes a la aplicación de  $\text{NO}_3^-$ -N (Mason, 1992; Strong y Cooper, 1992). Siendo un catión, el  $\text{NH}_4^+$ , es adsorbido por fuerzas electroestáticas a la superficie de las partículas de arcilla negativamente cargadas y a los grupos funcionales de la materia orgánica del suelo. Esta adsorción es suficiente para limitar las pérdidas



de N por infiltración (Amberger, 1993). Así, la nitrificación del  $\text{NH}_4^+$ -N resulta en la transformación del N de su forma relativamente inmóvil ( $\text{NH}_4^+$ ) a su forma altamente móvil ( $\text{NO}_3^-$ ), lo cual provee un mayor potencial para que el N se vuelva susceptible a la infiltración. Esta transformación además facilita que el N se escape a la atmósfera en forma de moléculas gaseosas ( $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$ , y  $\text{N}_2$ ) (Figura 1). Estas pérdidas de N reducen la efectividad de las fertilizaciones nitrogenadas y pueden tener serias implicaciones ambientales cuando excesos de N entran a un sistema natural (Jarvis, 1996). Aparte de la volatilización del amoníaco (Grant *et al.*, 1996), la nitrificación se asocia con la mayoría de las principales vías de pérdidas de N, la desnitrificación y la pérdida de  $\text{NO}_3^-$  por escorrentía (Barker y Mills, 1980). Desde el punto de vista agrícola, manteniendo el N en la forma de  $\text{NH}_4^+$  tiene la ventaja de extender el tiempo que el N se mantiene en la rizósfera, brindando a la planta más tiempo para que pueda absorberlo (Slangen and Kerkhoff, 1984).

### **2.3.2 Nitrificación y sistemas de producción agrícolas presentes y futuros**

La nitrificación parece desempeñar un papel relativamente menor en muchas comunidades clímax de ecosistemas naturales. Este hecho es contrastante con los sistemas de producción agrícola a gran escala donde la nitrificación es un proceso vital que causa un impacto importante al ciclo del N (Haynes y Goh, 1978). Los sistemas agrícolas modernos depende asiduamente de aplicaciones masivas de fertilizantes nitrogenados para mantener su productividad ya que el N fijado de forma natural no es el adecuado para los sistemas de producción a gran escala (Dinnes *et al.*, 2002; Evenson y Gollin, 2003). Las leguminosas, usando su

capacidad para fijar el N atmosférico vía simbiosis con microorganismos de la rizósfera, suplen la cantidad de N fijado disponible para los cultivos.

El siglo 20 fue testigo de cambios significativos generados por el desarrollo acelerado de los sistemas de producción agrícolas modernos (Rabalais *et al.*, 2006):

- 1) Disminución en el uso de diversos cultivos de rotación.
- 2) Separación de los sistemas de producción de cultivos de la producción ganadera.
- 3) Cambios en la intensidad de arado y cultivo del suelo.
- 4) Aumento en el riego y drenaje de suelos agrícolas.
- 5) Incremento en el uso de fertilizantes nitrogenados.

En la década de los 50's los cereales se cultivaban generalmente en rotación con leguminosas (tales como soya, frijol común, alfalfa, garbanzo, entre otros). El N fijado simbióticamente junto con el N obtenido de la mineralización de la materia orgánica y los abonos de origen animal eran las fuentes principales de N para la mayoría de sistemas de producción cereales tanto en países desarrollados y en vías de desarrollo de todo el mundo (Dinnes *et al.*, 2002 ). Posterior a la Segunda Guerra Mundial, un incremento en la disponibilidad de fertilizantes nitrogenados de bajo costo junto con una disminución en la demanda de cultivos forrajeros condujo a una reducción significativa en el uso de cultivos de rotación. En general, los fertilizantes nitrogenados han reemplazado los cultivos de rotación como principal

fuentes de N en muchas regiones del mundo. Con el uso constante de fertilizantes nitrogenados, los abonos de origen animal ya no se utilizan como fuente mayor de nutrientes en la producción de cultivos. Esto provocó la separación de los nexos entre la producción de cultivos y la producción animal lo cual hizo que el reciclamiento de los desechos animales se dificulte y se haga más costoso. Otro efecto no premeditado del uso a gran escala de los fertilizantes nitrogenados es una disminución general de la materia orgánica del suelo a escala mundial (McGill *et al.*, 1981; Lal, 2003; Bellamy *et al.*, 2005).

Adicionalmente, la instalación de sistemas de drenaje subterráneos en muchas partes desarrolladas del mundo ha causado la aceleración de la infiltración del  $\text{NO}_3^-$ , lo cual ha resultado en una reducción substancial de la eficiencia del ciclo del N (i.e., NUE) (Dinnes *et al.*, 2002). Los sistemas de producción agrícolas modernos a gran escala resultan en condiciones que promueven la nitrificación, disminuyen la NUE y reducen la materia orgánica del suelo (McGill *et al.*, 1981; Peng *et al.*, 2005).

### **2.3.3 Impactos positivos de la nitrificación en el ciclo del N**

En algunos casos la nitrificación puede conllevar a la retención de N, especialmente en suelos alcalinos donde existen pérdidas altas de N a partir de la volatilización del amoníaco. En condiciones de pH alcalino, es posible que la nitrificación facilite la retención del N al convertir rápidamente el amonio en nitrato-N, el cual no es susceptible a pérdidas por volatilización (Sahrawat 1989). La nitrificación sucedida por la desnitrificación también es importante en el manejo y

reciclamiento de desechos orgánicos incluyendo desechos nitrogenados generados a partir de excretas animales y humanas, y aguas servidas derivadas de procesos industriales. El amoníaco es la forma predominante de N en estos desechos, y la nitrificación es el proceso inicial para la remoción del N de estos desechos antes de ser liberados en el ambiente (Kowalchuk y Stephen, 2001).

#### **2.3.4 La materia orgánica del suelo (MOS) como fuente de $\text{NH}_4^+$ para la nitrificación.**

Existe un concepto errado en cuanto a la concepción de que los problemas asociados con la nitrificación, infiltración del  $\text{NO}_3^-$ , emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{NO}$ , son exclusivamente asociados con los fertilizantes nitrogenados inorgánicos aplicados a los sistemas agrícolas. La MOS nativa también experimenta la mineralización (proteólisis y amonificación) resultando en la liberación de cantidades substanciales de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  en el suelo (Mengel y Kirkby, 1978; Addiscott, 2000; Chikowo *et al.*, 2004). Independientemente de su origen, ya sea de fertilizantes nitrogenados o MOS, el  $\text{NH}_4^+$  sufre la misma nitrificación y también se pierde por procesos similares. El N de la MOS puede ser una parte significativa del N en suelos agrícolas sujeto a pérdidas de N por infiltración y emisiones gaseosas (i.e.,  $\text{N}_2\text{O}$  y  $\text{NO}$ ) (Bremner, 1965; Whitmore *et al.*, 1992).

#### **2.3.5 Preferencia de los cultivos de las formas de N.**

La mayor parte de los cultivos tienen la habilidad de asimilar y utilizar tanto el  $\text{NH}_4^+$  como el  $\text{NO}_3^-$  (Haynes y Goh, 1978). Generalmente una mezcla de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  es preferida como fuente de N (Michael *et al.*, 1970). Sin embargo, muchos cultivos

que crecen en suelo secos muestran una preferencia por  $\text{NO}_3^-$  sobre  $\text{NH}_4^+$  (Haynes y Goh, 1978). Los cultivos que están bien adaptados a condiciones anaeróbicas del suelo (tal como el arroz) y plantas adaptadas a suelos ácidos generalmente prefieren  $\text{NH}_4^+$  sobre  $\text{NO}_3^-$  (McKane *et al.*, 2002). Por otra parte, Castilla y Jackson (1991) reportaron que *B. humidicola* puede asimilar ambas formas de N. Esto sugiere que esta capacidad puede ser parte de un mecanismo adaptativo de *B. humidicola* a suelos ácidos.

### **2.3.6 Bases teóricas de la nitrificación como presión selectiva en sistemas biológicos.**

La asimilación del  $\text{NO}_3^-$  requiere una energía equivalente a 20 moles de ATP / mol de  $\text{NO}_3^-$ , mientras que la asimilación del  $\text{NH}_4^+$  requiere únicamente 5 moles de ATP / mol de  $\text{NH}_4^+$  (Salsac *et al.*, 1987). Se ha propuesto que esta diferencia en requerimientos energéticos para la asimilación de diferentes formas de N es una posible fuerza dinámica ecológica en el desarrollo de ecosistemas clímax. La inhibición de la nitrificación es un posible mecanismo ecológico que pudo tomar ventaja de la diferencia en eficiencia de energía en la asimilación de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$  (Rice y Pancholy, 1972). Los ahorros de energía de la asimilación del  $\text{NH}_4^+$  deberían conllevar a una mayor producción de biomasa en las plantas que crecen con  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  a diferencia de las que crecen con  $\text{NO}_3^-\text{-N}$ . No obstante, para la mayoría de los sistemas agrícolas, un balance de dos tercios a un tercio entre  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$  a menudo provee el mejor crecimiento de los cultivo y la mejor productividad (Subbarao *et al.*, 2006a).

### **2.3.7 Nitrificación y su impacto ambiental**

Alrededor del 70% de los fertilizantes nitrogenados aplicados en ecosistemas intervenidos se pierde a través de la nitrificación y procesos asociados (Raun y Johnson, 1999; Glass, 2003). Además, las pérdidas asociadas con la nitrificación (infiltración del  $\text{NO}_3^-$  y desnitrificación) a partir de la MOS mineralizada y los residuos orgánicos puede ser substancial. Esto se debe en mayor parte a la falta de sincronización entre la mineralización del N orgánico y la utilización del N por parte del cultivo (Addiscott, 2000; Chikowo *et al.*, 2004). Los fertilizantes nitrogenados aportan una cantidad significativa de la energía total que entra a los sistemas agrícolas. El nitrógeno incorporado en los cultivos agrícolas raramente excede el 40% del N aplicado con un promedio aproximado de 32%. Esto es un indicador de una seria ineficiencia en la utilización de N y energía en los sistemas agrícolas de alta producción (Raun y Johnson, 1999; Glass, 2003). Investigaciones recientes muestran que el N también se pierde en forma de emisiones de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) a través de las plantas durante el proceso de asimilación de  $\text{NO}_3^-$  en las hojas (Smart y Bloom, 2001).

### **2.3.8 Pérdidas de N asociadas con la nitrificación**

Las dos principales rutas de pérdidas de N durante y después del proceso de la nitrificación son emisiones gaseosas como dinitrógeno ( $\text{N}_2$ ) y óxidos de N ( $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$ ), y la infiltración del  $\text{NO}_3^-$ .

### 2.3.8.1 Pérdidas de N gaseoso

El N se pierde en formas gaseosas en los sistemas agrícolas:

- 1) Durante la oxidación biológica del  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  a  $\text{NO}_2\text{-N}$  por la acción de *Nitrosomonas* [i.e., durante la hidrólisis de la hidroxilamina por la acción de la enzima hidroxilamina oxidoreductasa (HAO)], se emite  $\text{N}_2\text{O}$  (Bremner y Blackmer, 1978).
- 2) Bajo condiciones anaeróbicas, la desnitrificación del nitrato (i.e., la conversión del nitrato en formas gaseosas –  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{N}_2$ ) por la acción de bacterias heterotróficas del suelo (*Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Achromobacter aerogenes*, *Aspergillus flavus*, *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., y *Penicillium atrovenetum*) (Moiser et al., 1996).
- 3) Durante la asimilación de nitrato por parte de las plantas,  $\text{N}_2\text{O}$  es emitido (Smart y Bloom, 2001).

### 2.3.8.2 Pérdidas de N por infiltración del $\text{NO}_3^-$ .

El  $\text{NO}_3^-$  se mueve fácilmente a través del suelo por difusión y con el flujo de la masa del agua (Vitousek et al., 2002; Herrmann et al., 2005). De este modo, existe un potencial para que una porción significativa del fertilizante nitrogenado aplicado y N mineralizado naturalmente se lixivie, se infiltre o se lave de la zona radicular (Baber and Wilson, 1972; Gulliam et al., 1985). Varios factores contribuyen a la infiltración y escurrimiento del  $\text{NO}_3^-\text{N}$  los cuales incluyen el tipo de suelo, las condiciones climáticas, y las condiciones de drenaje del suelo (Burns, 1977; Dinnes et al., 2002). Sistemas de cultivos tropicales y templados ofrecen un potencial para una alta infiltración del  $\text{NO}_3^-$  (Goss et al., 1988; Schroder et al.,

1993). Otro factor importante es la influencia de cantidades excesivas de N disponible (Schepers *et al.*, 1991) y la mineralización de la MOS (Addiscott, 2000; Chikowo *et al.*, 2004). Se estima que cerca de 1.75 billones de Mg de N orgánico se han perdido en los suelos agrícolas de los Estados Unidos durante el último siglo (Viets, 1975). Así, sin tomar en cuenta la fuente de N de la cual se deriva el  $\text{NO}_3^-$ , éste es susceptible a pérdidas por infiltración.

### **2.3.9 Impactos ambientales derivados de las pérdidas de N.**

Las pérdidas de N asociadas con la nitrificación pueden ser suficientemente abundantes para tener serias consecuencias ambientales y económicas para la sociedad (Mosier *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1997). La desnitrificación juega un papel en mantener la composición relativa de los niveles de oxígeno y N de la atmósfera. Por millones de años, la tasa de desnitrificación puede haber sido balanceada por la fijación de N (Crutzen y Ehnhalt, 1977). Los óxidos nitrosos que llegan a la estratósfera pueden destruir la capa de ozono (Crutzen and Ehnhalt, 1977; Crutzen, 1981).

Para sostener a la población humana actual se requiere usar cantidades vastas de N fijado industrialmente (Mosier *et al.*, 1996; Raun y Johnson, 1999). En la actualidad se aplican en forma de fertilizantes alrededor de 100 Tg de N / año a escala mundial con el fin de mantener la producción agrícola (Vitousek *et al.*, 1997; IFA, 2005). El consumo de fertilizantes nitrogenados se duplicará (i.e., 200 Tg N / año) antes del 2025 para satisfacer la creciente demanda de alimentos (Crutzen y Ehnhalt, 1977; Vitousek *et al.*, 1997). Se espera que este incremento en



el uso del N también incrementa tanto la nitrificación y desnitrificación del N (Smith *et al.*, 1997). Las pérdidas de N que ocurren durante la nitrificación y desnitrificación es causada por problemas inherentes a la conversión enzimática. Las estimaciones actuales sugieren que las emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$  se duplicarán de la tasa actual de 12.7 Tg N / año a 25.7 Tg N / año antes del 2025 (Kroeze, 1994). Este excedente de emisiones podría resultar en una reducción del 10% de la capa de ozono lo cual podría incrementar en un 20% la cantidad de radiación ultravioleta que alcanza la superficie terrestre (Crutzen and Ehhalt, 1977).

#### **2.3.9.1 Emisiones de NO y $\text{N}_2\text{O}$ y el calentamiento global**

El  $\text{N}_2\text{O}$  actúa en la atmósfera como un potente gas efecto invernadero y absorbe la radiación ultravioleta que se desprende de la superficie de la Tierra la cual debería liberarse en el espacio. La absorción de la radiación infrarroja limita el escape de la energía de la Tierra y la atrapa en la atmósfera lo cual resulta en un incremento en la temperatura promedio del planeta, el renombrado calentamiento global. Un incremento global de  $0.6^\circ\text{C}$  se ha reportado durante el último siglo (IPCC, 2001). El potencial de calentamiento global (GWP por su acrónimo en inglés) del  $\text{N}_2\text{O}$  es 296 veces más alto que el del  $\text{CO}_2$ , y alrededor de 13 veces más alto que el del metano (IPCC, 2001).

La agricultura es la mayor fuente de emisiones de  $\text{N}_2\text{O}$ , contribuyendo con casi el 70% de las emisiones antropogénicas totales (Mosier, 1993; Smith *et al.*, 1997). Las emisiones globales de  $\text{N}_2\text{O}$  en tierras cultivadas se estiman actualmente en casi 3.5 Tg  $\text{N}_2\text{O}$ -N anualmente, de las cuales 1.5 Tg son directamente atribuidas al

uso de fertilizantes sintéticos nitrogenados (Kroeze, 1994; Smith *et al.*, 1997). Para el 2100, las emisiones de  $N_2O$  provenientes de la producción y uso de fertilizantes nitrogenados se proyectan en 4.2 Tg de N / año, aproximadamente cuatro veces más que los niveles de emisión actuales (Kroeze, 1994; Mosier *et al.*, 1996).

Por otra parte, aunque el NO no es un gas efecto invernadero puede ser convertido en ácido nítrico, el cual es reciclado en la forma de lluvia ácida contribuyendo a la acidificación y eutroficación de los ecosistemas. También se deduce que esta problemática se acentuará proporcionalmente con el incremento en el uso de fertilizantes nitrogenados (Subbarao *et al.*, 2006a).

#### **2.3.9.2 Contaminación con $NO_3^-$ y la eutrofización**

Uno de los problemas asociados con la nitrificación es la infiltración del  $NO_3^-$  y la contaminación de los acuíferos subterráneos y otros cuerpos de agua (Schepers *et al.*, 1991; Giles, 2005). El consumo humano y animal de nitrato conlleva a riesgos en la salud siendo uno de los principales la metahemoglobinemia en infantes (Shuval y Gruener, 1972) y el envenenamiento con  $NO_3^-$  en animales (NRC, 1972).

La contaminación con nitrato de los cuerpos de agua a menudo causa la eutrofización mediante la estimulación del crecimiento de organismos fototróficos y heterotróficos. Esto hace que sus biomasas se incrementen y contrariamente su biodiversidad se reduzca. El incremento excesivo en la producción de biomasa hace que la calidad del agua se vea reducida (Vitousek *et al.*, 1997) y genere

problemas ambientales los cuales a su vez impactan negativamente los sistemas de explotación marítimos tales como la pesca

#### **2.3.10 Factores que afectan la nitrificación**

La nitrificación como un proceso biológico terrestre se ve influenciada por:

- 1) Factores físicos del suelo incluyendo textura y estructura
- 2) Factores químicos del suelo tales como pH, conductividad eléctrica, proporción C/N, capacidad de intercambio catiónico (CIC), y materia orgánica.
- 3) Factores ambientales del suelo, los cuales incluyen temperatura, humedad, aireación (i.e., niveles de O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>).

Las plantas tienen la facultad de modificar el ambiente físico, biológico y químico en el cual se desarrollan. Ellas cambian la disponibilidad del carbono y otros nutrientes a través mediante desalojo y por acción de los exudados de sus raíces y hojas. La nitrificación se desarrolla en estado continuo de flujo en ecosistemas intervenidos (tales como la capa arable) y naturales (bosques y sabanas). La nitrificación del NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N libera protones que acidifican el suelo. La capacidad estabilizadora natural del suelo influencia la tasa de nitrificación. Suelos con una baja capacidad estabilizadora se tornarán ácidos rápidamente con la nitrificación del NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N. Bajos niveles de pH en el suelo reducen la tasa de nitrificación (De Boer y Kowalchuk, 2001).

## **2.4 Posibles estrategias para la regulación de la nitrificación en sistemas agrícolas.**

### **2.4.1 Prácticas agrícolas**

Existen varias estrategias de manejo de las aplicaciones de fertilizantes nitrogenados que toman en consideración la época del año (estaciones climáticas) y la tasa de aplicación. Estas estrategias incluyen aplicaciones en verano vs. aplicaciones en otoño, aplicaciones basales vs. aplicaciones divididas, fertilización por bandeo vs. fertilización al boleó, aplicaciones superficiales vs. aplicaciones incorporadas, aplicaciones localizadas y foliares. Las aplicaciones foliares de urea se han usado para limitar la disponibilidad de  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  para los microbios nitrificantes del suelo. Otras estrategias se han desarrollado para sincronizar la aplicación de fertilizante con la demanda de N del cultivo y así facilitar la asimilación rápida del N y reducir el tiempo de residencia del  $\text{NO}_3^-\text{N}$  en el suelo. De este modo, se limita la desnitrificación y/o la pérdida del N por infiltración (Newbould, 1989; Timmons y Baker, 1991; Dinnes *et al.*, 2002). Muchas de estas estrategias agronómicas tienen limitaciones ya que acarrearán costos adicionales de mano de obra y otros tipos de dificultades prácticas (Powlson, 1993; Campbell *et al.*, 1995; Dinnes *et al.*, 2002).

### **2.4.2 Inhibidores químicos sintéticos**

Los inhibidores de la nitrificación son compuestos que retrasan la oxidación bacteriana del  $\text{NH}_4^+$  al disminuir la actividad de los microorganismos nitrificantes del suelo. Una serie de compuestos han sido desarrollados y patentados como inhibidores de la nitrificación los cuales se basan en la inhibición de la función

enzimática de los microorganismos nitrificantes. Se han realizado varios trabajos a nivel de campo para controlar la nitrificación a través de la aplicación de estos inhibidores sintéticos. Los resultados obtenidos de estos ensayos empíricos, sin embargo no han sido lo suficientemente convincentes y reproducibles para considerarlos exitosos. Estos inhibidores sintéticos han sido adoptados en algunos casos únicamente en los Estados Unidos, Europa, y Japón (Subbarao *et al.*, 2006a).

## **2.5 Inhibición biológica de la nitrificación (BNI)**

El concepto de plantas que liberan compuestos inhibitorios que suprimen la nitrificación en el suelo ya ha sido reportada (Lodhi, 1982; White 1988, 1991). Investigaciones recientes han mostrado que ciertos pastos tropicales tales como *Brachiaria humidicola* tienen la habilidad de liberar compuestos químicos de la raíz que inhiben o suprimen la nitrificación en el suelo, y este atributo ha sido nombrado inhibición biológica de la nitrificación (BNI) (Subbarao *et al.*, 2006b). BNI hace referencia a la liberación de compuestos biológicamente activos a partir de la raíz. Estos compuestos suprimen o regulan la función y el crecimiento de los microorganismos nitrificantes, y por consiguiente limitan la nitrificación en el suelo (Subbarao *et al.*, 2007a). Se empleó el término “inhibición biológica de la nitrificación (BNI) para distinguirlo de los inhibidores sintéticos producidos de forma industrial (Subbarao *et al.*, 2006b).

Se ha reportado en varias ocasiones que el pasto tropical *Brachiaria humidicola* produce ciertos compuestos químicos que inhiben la nitrificación en el suelo. Un

punto relevante de estos trabajos fue el uso de una cepa recombinante de *Nitrosomonas europaea* (bacteria nitrificante) para producir bioluminiscencia debido a la expresión de los genes *luxAB* (*Vibrio harvey*) durante la nitrificación (Subbarao *et al.*, 2006b). Esta aplicación condujo al desarrollo de un ensayo que permitió cuantificar la supresión de la nitrificación.

### **2.5.1 Modo de acción de los exudados de raíces como inhibidores de la nitrificación.**

El modo de acción de los exudados de las raíces de *B. humicola* como inhibidores de la nitrificación se basa en el bloqueo o la supresión de las rutas enzimáticas de las enzimas AMO y HAO y probablemente otras rutas metabólicas celulares en *N. europaea*. Una de las posibles hipótesis es que la actividad BNI en los exudados de las raíces no se debe a un único compuesto. Los resultados obtenidos de los ensayos de bioluminiscencia indican que podría haber aproximadamente diez compuestos responsables de los efectos inhibitorios observados en *N. europaea*. Una posibilidad podría ser que hay dos clases de compuestos inhibitorios, poseyendo cada uno un sitio específico de acción inhibitoria, ya sea para AMO o HAO. Otra posibilidad a considerar es que la interrupción de la ruta de transferencia de electrones, debida a la actividad BNI, interfiere con la función metabólica y de este modo con la emisión de luminiscencia por parte de *N. europaea* (Subbarao *et al.*, 2006b).

Las *Nitrosomonas* spp. se consideraban como el grupo predominante de bacterias amonía-oxidantes (pertenecientes a las proteobacterias) contribuyentes a la

amonía-oxidación aeróbica (Norton *et al.*, 2002). Sin embargo, se reportó recientemente que las archaeas amonía-oxidantes pertenecientes al filo crenarchaeota podrían ser el grupo predominante de microorganismos amonía-oxidantes en algunos ecosistemas edáficos (Leininger *et al.*, 2006). Tal diversidad en microorganismos amonía-oxidantes podría influir en el rango de compuestos presentes en los exudados de raíces que exhiben actividad BNI (Subbarao *et al.*, 2007b).

Por otra parte, Subbarao *et al.*, 2009 reportó que ‘brachialactona’, el inhibidor biológico de la nitrificación identificado recientemente en los exudados de raíces de *B. humidicola*, inhibió la función de las *Nitrosomonas* probablemente a través del bloqueo de dos rutas enzimáticas, AMO y HAO, las cuales están implicadas en el proceso de la amonía-oxidación. Sin embargo, el efecto inhibitorio en la ruta HAO es menor que el observado en la ruta AMO. Los extractos crudos de los exudados de las raíces con actividad BNI mostraron un efecto inhibitorio de eficiencia similar en ambas rutas enzimáticas. Esto sugiere que otros compuestos BNI liberados de las raíces poseen un modo de acción distinto que el encontrado para brachialactona.

La mayoría de los inhibidores de la nitrificación comerciales actúan exclusivamente en la ruta AMO. Este hecho los hace vulnerables a los cambios genéticos en las poblaciones nitrificantes o a la diversidad genética natural de los microorganismos amonía-oxidantes (Norton *et al.*, 2002; Belser, L. W., 1979). Dada la variabilidad genética inherente en las poblaciones nitrificantes (Norton *et al.*,

2002), es probable que los compuestos BNI liberados de *Brachiaria* spp. sean menos vulnerables a los cambios genéticos debido a sus diversos modos de acción sobre *Nitrosomonas* (Subbarao *et al.*, 2009).

### **2.5.2 Perspectivas para la regulación biológica de la nitrificación en sistemas agrícolas.**

La NUE intrínseca a nivel fisiológico es difícil de alterar en los cultivos, y probablemente resulta agronómicamente irrelevante. La mejor estrategia para mejorar la NUE (materia seca producida por unidad de N aplicado) sería lograr el incremento de la recuperación del N al extender el tiempo de disponibilidad del N aplicado. Suprimir la nitrificación y mantener el N en la forma de  $\text{NH}_4^+$  por más tiempo es una de las formas de mejorar la recuperación y la NUE agronómica en los sistemas agrícolas (Subbarao *et al.*, 2006a).

Tal como ya se mencionó anteriormente, la nitrificación tiene un impacto profundo en la recuperación del N y su utilización en los sistemas agrícolas. Las plantas estimulan o suprimen la actividad microbiana en la rizósfera a través de la liberación de varios compuestos orgánicos presentes en los exudados de las raíces (Baath *et al.*, 1978; VanVeen *et al.*, 1989; Liljeroth *et al.*, 1990; Parmelee *et al.*, 1993). Sorprendentemente se ha dado poca atención al papel que desempeñan las plantas en el proceso de la nitrificación y las diferencias inherentes entre los cultivos en términos de regulación de la nitrificación. A excepción de los últimos dos siglos los cultivos alimentarios principales se han desarrollado en sistemas naturales y posiblemente hayan originado varios



mecanismos genéticos/fisiológicos que influyen la nitrificación en el suelo (Subbarao *et al.*, 2006a).

Las diferencias en la habilidad nitrificante de los suelos de varios ecosistemas no se puede explicar considerando aisladamente las características físico-químicas del suelo (Clark *et al.*, 1960; Keeney, 1980; Montagnini *et al.*, 1989; Wedin and Tilman, 1990; Lata *et al.*, 2004). Cuando se identifican mecanismos específicos (tales como la liberación de compuestos orgánicos que tienen un efecto inhibitorio directo en los microorganismos nitrificantes) y su control genético se establece en especies de plantas que habitan sistemas naturales, podría ser posible transferir tales mecanismos genéticos específicos a otros cultivos de importancia alimentaria y agrícola. Adicionalmente, se especula que existen varios mecanismos en el caso de los principales cultivos alimentarios para la regulación de la nitrificación (ya sea inhibición o nitrificación). Es necesario entender y caracterizar estos mecanismos antes de evaluar su factibilidad de incorporación o transferencia a otros cultivos o especies. El descubrimiento y explotación genética de estos mecanismos biológicos podrían representar un nuevo enfoque para el fitomejoramiento (Subbarao *et al.*, 2006a).

### **2.5.3 Métodos de detección y cuantificación de los inhibidores de la nitrificación liberados en los sistemas planta-suelo.**

#### **2.5.3.1 Ensayo de bioluminiscencia para detectar inhibidores de la nitrificación liberados de las raíces: un estudio de caso con *Brachiaria humidicola*.**

Este ensayo usa una cepa recombinante de *Nitrosomonas europaea* (Iizumi y Nakamura, 1997; Iizumi *et al.*, 1998) para detectar y cuantificar la nitrificación que se ve afectada por los inhibidores liberados por las raíces de las plantas (actividad BNI). La *N. europaea* recombinante produce bioluminiscencia a causa de la expresión de los genes “*luxAB*” (introducidos de *Vibrio harveyi*) durante la nitrificación. Esta cepa fue originalmente construida para detectar/monitorear inhibidores de la nitrificación en aguas servidas de plantas de tratamiento (Iizumi y Nakamura, 1997; Iizumi *et al.*, 1998). La bioluminiscencia producida en este ensayo se correlaciona directamente con la producción de  $\text{NO}_2^-$  ( $r^2 = 0.94$ ) (Subbarao *et al.*, 2006b).

Usando este bioensayo se detectaron cantidades significativas de un inhibidor de la nitrificación producido por las raíces de *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweick. La cantidad de actividad BNI producida por las raíces se expresó en unidades definidas en términos de la acción de un inhibidor estándar, alitiourea (AT). Las rutas metabólicas de las enzimas amonía-monooxigenasa (AMO) e hidroxilamina oxidoreductasa (HAO) en *Nitrosomonas* se vieron efectivamente bloqueadas por la actividad BNI liberada de las raíces de *B. humidicola* (Subbarao *et al.*, 2006b).

Adicionalmente, este ensayo arrojó evidencia que la producción de químicos (exudados) por parte de las raíces de *Brachiaria humidicola*, conocidos como inhibidores biológicos de la nitrificación (BNIs), están bajo el control de la planta. No obstante, la inducción o regulación molecular de los BNIs no ha sido hasta el momento estudiada. Del mismo modo, el notable incremento en la producción de BNIs en respuesta a los altos niveles de  $\text{NH}_4^+$  sugiere que el  $\text{NH}_4^+$  puede tener una función especializada en este proceso (Fillery, 2007).

#### **2.5.4 Métodos para estudiar y caracterizar el fenómeno BNI en el sistema planta-suelo.**

##### **2.5.4.1 Determinación de tasa de oxidación del amonio**

Este método fue desarrollado por Belser y Mays (1980) para determinar la tasa de oxidación potencial del amonio en muestras naturales a través de la medición de la cantidad de nitrito producido. La adición de clorato a las muestras evita que el nitrito se oxide a nitrato. La efectividad y especificidad del clorato se ha probado con cultivos puros de nitrito y microorganismos oxidantes de amonio así como también en el suelo y en sedimentos fangosos.

##### **2.5.4.2 Medición de las emisiones de óxido nitroso**

Este método se basa en el uso de una cámara estática (Holland *et al.*, 1999) a partir de las cuales se colectan muestras de aire a diferentes intervalos de tiempo usando jeringas descartables. Las muestras son analizadas posteriormente para determinar los niveles de  $\text{N}_2\text{O}$  a través de un cromatógrafo de gases equipado con un detector de captura de electrones.

### **2.5.4.3 Estudio de la diversidad microbiana del suelo**

#### **2.5.4.3.1 Limitaciones principales**

##### **2.5.4.3.1.1 Heterogeneidad espacial**

Cuando se estudia la diversidad microbiana del suelo se utilizan muestras replicadas de 1 a 5 g de suelo a partir de las cuales se establecen conclusiones para la comunidad microbiana en general. Existen numerosos problemas con este método. Uno es la heterogeneidad innata del suelo y la distribución espacial de los microorganismos (Trevors, 1998). Franklin y Mills (2003) reportaron que las comunidades microbianas pueden tener varios niveles anidados de organización, y que las comunidades pueden ser dependientes de las diferentes propiedades o grupos de propiedades del suelo.

##### **2.5.4.3.1.2 Incapacidad de cultivar microorganismos del suelo**

La inmensa diversidad fenotípica y genética de las comunidades bacterianas y de hongos del suelo las hace unas de las comunidades más difíciles de estudiar (Ovreas *et al.*, 1998). Se ha sugerido que al menos el 99% de las bacterias observadas al microscopio no son cultivables a través de técnicas de laboratorio comunes (Borneman *et al.*, 1996; Giller *et al.*, 1997; Pace 1997; Torsvik *et al.*, 1998; Trevor, 1998).

En lo que respecta a los microorganismos amoníaco-oxidantes, debido su metabolismo quimio-litotrófico estos microorganismos tienen una tasa de crecimiento extremadamente baja con tiempos de generación entre ocho horas y varios días junto con la habilidad de sobrevivir largos períodos en un estado de

dormancia (Watson *et al.*, 1989). Esto hace que los métodos de cultivo tradicionales basados en las técnicas de número más probable (NMP) (Matulewich *et al.*, 1975) o selección (Ford *et al.*, 1980) no resulten viables en términos de tiempo. Adicionalmente, estos métodos resultan a menudo en bajas eficiencias de cuantificación (Belser, 1979) y conllevan a una colección de microorganismos amonia-oxidantes que no es representativa de la diversidad y abundancia actual de los hábitats en estudio (Hiorns *et al.*, 1995; Stephen *et al.*, 1996).

#### **2.5.4.3.2 Métodos para estudiar la diversidad microbiana del suelo**

##### **2.5.4.3.2.1 Conteo (plate counts)**

Este método es rápido, económico y puede generar información del componente activo heterotrófico de la población en estudio. Las dificultades principales radican en el desprendimiento de bacterias o esporas de las partículas de suelo, la selección de los medios de crecimiento (Tabacchioni *et al.*, 2000), las condiciones de crecimiento (temperatura, pH, luz), la incapacidad de cultivar una gran cantidad de especies de microorganismos con las técnicas actuales de laboratorio, entre otras (Kirk *et al.*, 2004).

##### **2.5.4.3.2.2 Métodos basados en PCR**

Los métodos moleculares para estudios ecológicos dependen de la clonación de genes de interés aislados a partir de muestras ambientales (Muyzer y Smalla, 1999). Aunque el proceso de secuenciación se considera rutinario en la actualidad, la secuenciación de miles de clones resulta tediosa (Tiedje *et al.*, 1999). Por lo tanto, se han desarrollado otras técnicas para estudiar la diversidad microbiana. En

estos métodos se extrae y purifica el DNA de muestras ambientales y la secuencia de interés se amplifica usando primers universales o específicos y los productos obtenidos se analizan de varias formas (Kirk *et al.*, 2004).

#### **2.5.4.4 Cuantificación de microorganismos amonía-oxidantes del suelo.**

Debido a la dificultad que implica el aislamiento y posterior obtención de un cultivo puro de estos microorganismos en condiciones de laboratorio es necesario adoptar alternativas complementarias para estudiar las poblaciones de bacterias amonía-oxidantes (AOB) y archaeas amonía-oxidantes (AOA) del suelo. Varias técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) fueron desarrolladas para detectar AOB en varios ambientes. Sin embargo, FISH consume mucho tiempo y es difícil de usar en muestras de suelo, y además requiere de células fisiológicamente activas (Okano *et al.*, 2004). Otros métodos incluyen el número más probable, ELISA, y PCR competitivo basado en métodos tradicionales de amplificación. No obstante, todos estos métodos tienen desventajas prácticas para estudiar con precisión las poblaciones microbianas de muestras ambientales. Por lo tanto, un método más confiable y reproducible para cuantificar estos microorganismos sería valioso para evaluar correlaciones entre actividades microbianas y número de genes o células, el efecto de diferentes tratamientos en la densidad celular, y cambios poblacionales en el tiempo y el espacio (Hermansson y Lindgren, 2000).

#### **2.5.4.5 Aplicación de la PCR en Tiempo-Real para cuantificar microorganismos amonia-oxidantes del suelo.**

La PCR en Tiempo-Real usa una molécula fluorescente cuya fluorescencia emitida se mide continuamente durante la amplificación de la reacción. La técnica no requiere ningún tipo de manipulación una vez completados los ciclos de amplificación. A diferencia de la PCR convencional cuyo punto de detección del producto de interés se logra al final de la reacción, los cálculos aplicados en la PCR en Tiempo-Real se basan en la fase exponencial inicial de la reacción de PCR (Okano *et al.*, 2004).

Un experimento basado en la aplicación de la PCR en Tiempo-Real se desarrolló para amplificar y cuantificar el gen amonia-monooxigenasa (*amoA*) y así estimar el tamaño de la población de AOB en respuesta a la presencia de amonio en el suelo. Este estudio fue el primero en desarrollar y aplicar la PCR en Tiempo-Real para cuantificar los genes *amoA* en el suelo y comparar su dinámica en respuesta a las concentraciones de amonio y nitrito (Okano *et al.*, 2004).

La PCR en Tiempo Real representa una herramienta molecular apropiada para estudiar el fenómeno BNI a través de la cuantificación absoluta de los genes de los microorganismos del suelo directamente involucrados en el proceso de la nitrificación: bacterias amonia-oxidantes (AOB) y archaeas amonia-oxidantes (AOA). A través de esta herramienta se podrá estimar su actividad funcional microbiana basada en el conteo de genes específicos para determinar el efecto inhibitorio de los exudados de *B. humicola* (actividad BNI) sobre la actividad

amonía oxidante de estos microorganismos. La aplicación de la PCR en Tiempo-Real en estimaciones y estudios del tamaño de poblaciones de AOB del suelo ya ha sido reportada con éxito (Okano, *et al.*, 2004; Hermansson y Lindgren, 2000), por lo que su aplicación en el estudio del fenómeno BNI permitirá generar resultados moleculares (número de genes de AOB y AOA) que complementen la información obtenida a través del método de bioluminiscencia y mediciones químicas.



### 3. HIPÓTESIS

El número de genes funcionales de los microorganismos amonia-oxidantes del suelo, bacterias amonia-oxidantes (AOB) y archaeas amonia-oxidantes (AOA), se ve afectado (reducido) debido al efecto de los exudados de las raíces de los genotipos de *Brachiaria humidicola* evaluados. Estos exudados bloquean la acción enzimática de las AOB y AOA y por consiguiente inhiben la nitrificación (actividad BNI) en el suelo.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 General

Determinar el efecto de los exudados de raíces de genotipos de *Brachiaria humidicola* en el número de genes funcionales de AOB y AOA del suelo y asociar los tamaños poblacionales de estos microorganismos con la actividad de la inhibición biológica de la nitrificación (BNI) en *B. humidicola*.

### 4.2 Específicos

Implementar y estandarizar la metodología de la PCR en Tiempo-Real para determinar la actividad BNI en tres genotipos de *B. humidicola*.

Generar datos moleculares obtenidos a partir de la cuantificación de genes de AOB y AOA que evidencien la ocurrencia del fenómeno BNI en el suelo usando como modelo el pasto tropical *B. humidicola*.

Determinar la actividad BNI en *B. humidicola* en respuesta a la aplicación de sulfato de amonio al suelo.

## 5. JUSTIFICACIÓN

El estudio propuesto aborda una temática importante relacionada con la NUE en cultivos. Únicamente el 33% del N total aplicado al suelo (en forma de fertilizantes nitrogenados) en la producción de cereales a escala mundial es utilizada por las plantas en el desarrollo del grano. El 67% restante que se pierde por escorrentía y volatilización está valorado en US \$20 billones anuales (Raun y Johnson, 1999) cuando los fertilizantes eran al menos dos veces más económicos que en la actualidad.

Las prácticas agrícolas convencionales o las herramientas de la agricultura de precisión destinadas a administrar el suplemento de N y la disponibilidad del mismo para las plantas no son suficientes para prevenir las enormes pérdidas del N aplicado. El desarrollo de variedades con mejores tasas de NUE es una de las opciones para optimizar el uso de los fertilizantes y maximizar la ganancia monetaria de los productores agrícolas. Esto además puede prevenir de manera significativa las pérdidas de fertilizantes nitrogenados hacia los reservorios acuíferos naturales (superficiales y subterráneos) y hacia la atmósfera en la forma de  $N_2O$ , reduce la contaminación ambiental y el calentamiento global.

El N es principalmente aplicado a los sistemas agrícolas en la forma de amonio ( $NH_4^+$ ), el cual es convertido rápidamente en  $NO_3^-$  por la acción de microorganismos amonia-oxidantes del suelo a través del proceso de la nitrificación. El N en la forma de  $NH_4^+$  se adhiere fuertemente a las partículas del suelo, pero una vez es convertido a  $NO_3^-$  se infiltra a través de las capas del suelo

llegando a las corrientes y cuerpos de agua. El óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) resulta de la reducción del  $\text{NO}_3^-$ , el cual se escapa a la atmósfera causando el efecto invernadero. Por lo tanto, mantener la mayor parte del N en la forma de  $\text{NH}_4^+$  es una de las metas más importantes del manejo del N. Algunos cultivos poseen la habilidad de inhibir el proceso de la nitrificación (conversión del  $\text{NH}_4^+$  en  $\text{NO}_3^-$  por acción de los microorganismos del suelo) a través de la liberación de sus exudados que bloquean/inhiben la acción de los microorganismos amonía-oxidantes. Este proceso es llamado inhibición biológica de la nitrificación (BNI), durante el cual un nivel alto de  $\text{NH}_4^+$  se hace disponible para la absorción por parte de la planta y por lo tanto una mayor NUE (Subbarao *et al.*, 2006a).

Experimentos preliminares realizados en el CIAT han producido resultados prometedores inicialmente en genotipos del pasto tropical *Brachiaria humidicola*. Niveles altos de actividad BNI fueron reportados en algunos de estos genotipos usando metodologías bioquímicas (bioluminiscencia) y químicas (medición de  $\text{NO}_3^-$ ). Sin embargo, no se ha reportado hasta el momento datos moleculares basados en el conteo de genes de las poblaciones de microorganismos del suelo involucrados en la nitrificación que soporten los resultados antes mencionados acerca de la actividad BNI en *B. humidicola*. Al obtener una evidencia molecular de la ocurrencia del fenómeno BNI, esfuerzos futuros se centrarán en identificar los genes que rigen la característica BNI en cultivos de importancia alimentaria y en especies usadas como modelos genéticos. Esto facilitará los programas de mejoramiento genético enfocados a mejorar la NUE en cultivos. Subsecuentemente, este hecho tendrá un gran impacto potencial en asuntos

agrícolas, ambientales, socio-económicos, y de salud humana relacionados con los fertilizantes nitrogenados.

En la actualidad se han desarrollado metodologías químicas (cuantificación de los productos derivados de la nitrificación:  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$ ) y bioquímicas (ensayo de bioluminiscencia con una cepa recombinante de *N. europaea*) para determinar la ocurrencia y estudiar el fenómeno BNI en el sistema planta-suelo (Subbarao *et al.*, 2006b; Rondón *et al.*, 2006). Sin embargo, estas metodologías no permiten medir el efecto inhibitorio de los exudados de las raíces en las poblaciones de AOB y AOA en su ambiente natural (suelo), las cuales participan directamente en el proceso de la nitrificación. Además de los métodos existentes, es necesario implementar una herramienta molecular basada en el conteo de genes de estos microorganismos para estimar su actividad microbiana y así desarrollar una metodología integrada (bioquímica, química, y molecular) que permita obtener información detallada del fenómeno BNI.

Debido a la dificultad que implica el aislamiento y posterior obtención de un cultivo puro de estos microorganismos en condiciones de laboratorio es necesario adoptar alternativas complementarias para estudiar las poblaciones AOB y AOA del suelo. Varias técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) fueron desarrolladas para detectar AOB en varios ambientes. Sin embargo, FISH consume mucho tiempo y es difícil de usar en muestras de suelo, y además requiere de células fisiológicamente activas (Okano *et al.*, 2004). Otros métodos incluyen el número más probable, ELISA, y PCR competitivo basado en métodos

tradicionales de amplificación. No obstante, todos estos métodos tienen desventajas prácticas para estudiar con precisión las poblaciones microbianas de muestras ambientales. Por lo tanto, un método más confiable y reproducible para cuantificar estos microorganismos sería valioso para evaluar correlaciones entre actividades microbianas y número de genes o células, el efecto de diferentes tratamientos en la densidad celular, y cambios poblacionales en el tiempo y el espacio (Hermansson y Lindgren, 2000). La PCR en Tiempo Real representa una herramienta molecular apropiada para estudiar el fenómeno BNI a través de la cuantificación absoluta de los genes de los microorganismos del suelo directamente involucrados en el proceso de la nitrificación: bacterias amonía-oxidantes (AOB) y archaeas amonía-oxidantes (AOA). A través de esta herramienta se podrá estimar su actividad funcional microbiana basada en el conteo de genes específicos para determinar el efecto inhibitorio de los exudados de *B. humidicola* (actividad BNI) sobre la actividad amonía oxidante de estos microorganismos. La aplicación de la PCR en Tiempo-Real en estimaciones y estudios del tamaño de poblaciones de AOB del suelo ya ha sido reportada con éxito (Okano, *et al.*, 2004; Hermansson y Lindgren, 2000), por lo que su aplicación en el estudio del fenómeno BNI permitirá generar resultados moleculares (número de genes de AOB y AOA) que complementen la información obtenida a través del método de bioluminiscencia y mediciones químicas.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1. Material vegetal

El material vegetal en estudio se seleccionó con base en la habilidad de las raíces para inhibir la nitrificación (determinada a través del ensayo de bioluminiscencia) expresada en unidades de allylthiourea (ATU) (Tabla 1). Dicho material consistió de dos accesiones de *B. humidicola*: el material comercial de referencia *B. humidicola* CIAT 679 (con una actividad BNI de 17.3 ATU/g peso seco de raíz/día) (Subbarao *et al.*, 2007a), y *B. humidicola* CIAT 16888 (una accesión del germoplasma con una actividad BNI de 53.8 ATU/g peso seco de raíz/día) (datos no publicados). Adicionalmente se incluyó *Brachiaria* híbrido cv. Mulato (un pasto mejorado con una actividad BNI de 10.2 ATU/g peso seco de raíz/día) (datos no publicados), *Panicum maximum* cv. Común (con una actividad BNI de 3.3 ATU/g peso seco de raíz/día) (Subbarao *et al.*, 2007a), soya cv. ICAP 34 (la cual carece de actividad BNI en sus raíces) (Subbarao *et al.*, 2007a), y el control (suelo desnudo sin plantas). Este material vegetal se usó para validar la efectividad de los exudados de raíces de *B. humidicola* en suprimir o inhibir la nitrificación en el suelo y las emisiones de óxido nitroso.

**Tabla 1.** Variación en la actividad BNI de pastos de *Brachiaria* determinada a través del ensayo de bioluminiscencia usando exudados de raíces.

Espece	Actividad BNI total liberada de cuatro plantas por día, ATU/día*	Actividad BNI específica, ATU/g peso seco raíz/día
<i>B. humidicola</i> (CIAT 679)	81.9 ± 3.7	17.3 ± 0.3
<i>B. humidicola</i> (CIAT 16888)	160.9 ± 3.0	53.8 ± 8.7
<i>Brachiaria</i> híbrido (Mulato)	84.5 ± 5.6	10.2 ± 1.1

Las plantas se cultivaron en un sustrato con arena, arcilla, y materia orgánica tipo Oxisol de los Llanos (Matazul) de Colombia (4 kg/pote; 4 plantas/pote) por 180 días en condiciones de invernadero. Se aplicó N en la forma de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  líquido a razón de 38.5 mg de  $\text{NH}_4$  N por kg de suelo (equivalente a 100 kg de  $\text{NH}_4$  N por ha) un mes anterior a la cosecha de las plantas para la obtención de los exudados de raíces. Los valores representan promedios ± desviación estándar de 4 repeticiones.

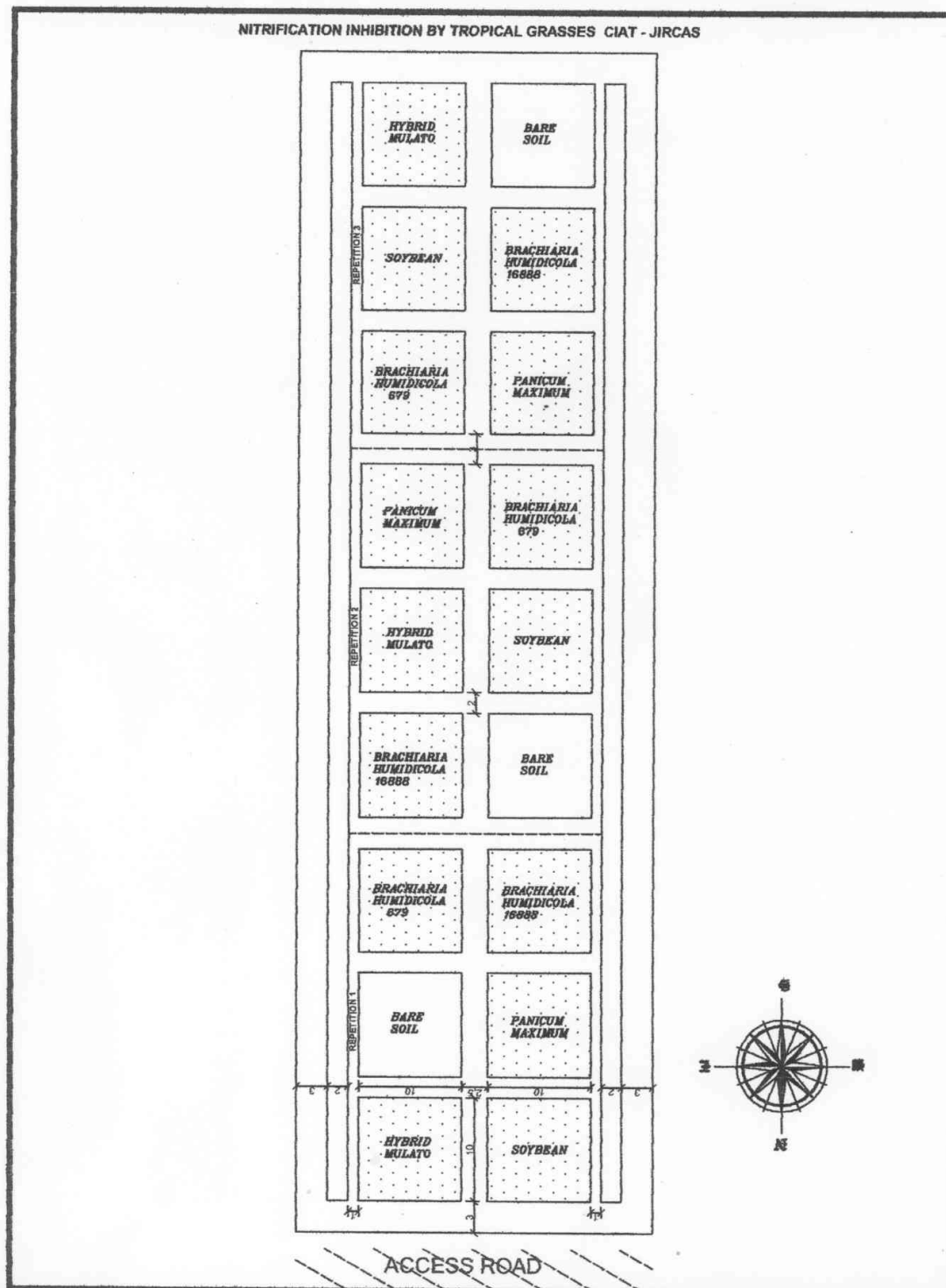
\*Para coleccionar los exudados de raíces, las plantas se cosecharon del suelo y las partículas del mismo se removieron cuidadosamente; las raíces intactas se lavaron con agua potable y posteriormente sumergidas en 1 L de solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1mM con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CaCl}_2$  durante 24 horas. La actividad BNI se determinó a través de bioluminiscencia con base en la habilidad de las raíces para inhibir la nitrificación expresada en unidades de allylthiourea (ATU)

## 6.2 Validación en campo de la efectividad de *B. humidicola* en suprimir la nitrificación en el suelo y las emisiones de óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ).

Un experimento a nivel de campo se estableció en Agosto 30 de 2004 y continuó hasta Noviembre de 2007 en las instalaciones del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) ( $3^\circ 30'\text{N}$ ,  $76^\circ 21'\text{W}$ ) en un suelo de clasificación Vertisol (Typic Pellustert), pH 7.4, con una precipitación promedio anual de aproximadamente 1000 mm, temperatura promedio anual de  $26^\circ\text{C}$ , y una elevación de 965 msnm. Los tratamientos evaluados fueron los siguientes: 1) *B. humidicola* (CIAT 679), 2) *B. humidicola* (CIAT 16888), 3) *Brachiaria* híbrido cv. Mulato, 4) *Panicum maximum*, 5) Soya cv. ICAP 34 (estimulante de la nitrificación), y 6) Control (suelo desnudo sin plantas). Estos tratamientos se



seleccionaron con base en sus niveles de actividad BNI a partir de análisis químicos previos basados en la cuantificación de los productos derivados de la nitrificación  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{NO}_3^-$  principalmente, y datos provenientes de ensayos de bioluminiscencia (Rondón *et al.*, 2006; Subbarao *et al.*, 2006c; Subbarao *et al.*, 2007). La unidad experimental consistió de una parcela de 10x10 m (100 m<sup>2</sup>). Se usaron tres repeticiones biológicas en un diseño estadístico de bloques completos al azar (BCA) con tres repeticiones biológicas (Subbarao *et al.*, 2006c) (Figura 2). Se hizo dos fertilizaciones tomando como referencia cada ciclo completo del cultivo de la soya. En la primera fertilización (4 semanas después de la siembra), las parcelas se fertilizaron (kg/ha) con: 48 N, 48 K, 16 P, 0.4 Zn, y 0.4 B; y en la segunda fertilización (8 semanas después de la siembra) se aplicó únicamente N a razón de 48 kg/ha. Todos los tratamientos incluyendo las parcelas de suelo desnudo recibieron la misma cantidad de fertilizante al mismo tiempo. Los pastos se cortaron dos veces al año (para simular el pastoreo), lo cual coincidió con la cosecha del cultivo de la soya. Los niveles de N inorgánico en el suelo fueron monitoreados (30 días después de la fertilización con sulfato de amonio) dos veces al año. Para la toma de muestras de suelo usadas en determinación de las tasas de nitrificación y las emisiones de N<sub>2</sub>O, y la cuantificación de los genes de las bacterias y arqueas amonía-oxidantes (AOB y AOA, respectivamente), dos cuadrantes de 1 m<sup>2</sup> dentro de cada unidad experimental fueron marcadas como subparcelas de muestreo permanentes.



**Figura 2.** Mapa del diseño experimental del experimento en campo para validar la efectividad de *B. humidicola* en suprimir la nitrificación en el suelo y las emisiones de óxido nitroso ( $N_2O$ ).

### 6.3 Colecta de las muestras de suelo

Para minimizar la variabilidad espacial del N aplicado, el fertilizante se aplicó en forma de sulfato de amonio disuelto en agua en cada subparcela de 1 m<sup>2</sup>. Esta fertilización se hizo con el fin de estimular tanto la actividad amonia-oxidante de los microorganismos y la liberación de exudados por parte de las raíces de los cultivos. Tres años después de establecerse las parcelas de cultivo (Noviembre de 2007), las muestras de suelo se colectaron de las subparcelas a 1 y 30 días después de la fertilización con sulfato de amonio en el quinto ciclo de crecimiento del cultivo (1 ciclo corresponde a podar o cosechar el follaje del cultivo y dejarlo brotar nuevamente). Con la ayuda de un barreno se colectaron cinco muestras de suelo de la zona de la rizósfera a 10 cm de profundidad de cada subparcela; posteriormente las muestras de las dos subparcelas se mezclaron para obtener una muestra compuesta de cada unidad experimental. Las muestras de suelo se cosecharon 1 día después de la fertilización nitrogenada con el propósito de determinar el efecto directo de los exudados de las raíces en las poblaciones de microorganismos amonia-oxidantes las cuales se multiplicarán debido al efecto de la fuente de amonio suplida con la fertilización; y 30 días después de la fertilización para determinar el efecto acumulativo de los exudados de las raíces sobre las poblaciones de microorganismos amonia-oxidantes. El suelo rizosférico (suelo adherido a las raíces) fue separado manualmente y usado en los análisis químicos (cuantificación de los productos derivados de la nitrificación – NO<sub>2</sub><sup>-</sup> y NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y moleculares (conteo de genes funcionales de AOB y AOA) subsecuentes.

En el cuarto ciclo únicamente, las muestras de suelo se cosecharon 30 días después de la fertilización nitrogenada a base de sulfato de amonio con el fin de determinar al igual que en el quinto ciclo, el efecto acumulado de los exudados de las raíces sobre las poblaciones de microorganismos amonia-oxidantes (actividad BNI). Todas las muestras de suelo correspondientes a un tiempo de muestreo específico se usaron para cuantificar nitrito –  $\text{NO}_2^-$ , nitrato –  $\text{NO}_3^-$ , y amonio –  $\text{NH}_4^-$  usando el método de extractos de espectrometría visible. Las mismas muestras de suelo adicionalmente se sometieron a un análisis molecular para cuantificar los genes funcionales de interés de las poblaciones de microorganismos amonia-oxidantes a través de PCR en Tiempo-Real. Al momento de colectar las muestras de suelo se registró la temperatura del mismo expresada en °C.

#### **6.4 Cuantificación de genes funcionales de microorganismos amonia-oxidantes del suelo a través de PCR en Tiempo-Real.**

##### **6.4.1 Primers usados para la amplificación y cuantificación de los genes de interés.**

La cuantificación de los genes de las AOB y AOA se hizo a través de PCR en Tiempo-Real usando las combinaciones de primers amoA-1F/amoA-2R (Rotthauwe *et al.*, 1997), amoA19F (Leininger *et al.*, 2006)/amoA643R (Treusch *et al.*, 2005), BACT1369F/PROK1541R (Treusch *et al.*, 2005), y Arch20F/Arch958R (DeLong, 1992) para el gen amoA de AOB, amoA de AOA, SSU rRNA de bacteria, y SSU rRNA de archaea, respectivamente. Las secuencias de estos primers así como también el tamaño esperado de los productos de PCR se presentan en la Tabla 2.

La combinación amoA-1F / amoA-2R amplifica el gen amoA de bacterias amonía-oxidantes autotróficas pertenecientes a la subclase  $\beta$  de las proteobacterias. Estos primers fueron diseñados con base en alineamientos de secuencias del gen amoA disponibles públicamente (Rotthauwe et al., 1997). Para amplificar y cuantificar el gen *amoA* de archaeas se usó la combinación de primers amoA19F - primer diseñado para análisis filogenéticos - (Leininger et al., 2006) / amoA643R; este último primer fue diseñado a partir de una secuencia (clon 54d9) de archaea y de secuencias de archaeas marinas - mar de los Sargazos – (Treusch et al., 2005). El gen SSU rRNA de bacterias se cuantificó con la combinación BACT1369 F / PROK1541 R, la cual cuantifica el número de copias de las subunidades pequeñas ribosomales de los rRNAs bacterianos (SSU rRNA) en muestras ambientales (Suzuki et al., 2000). La combinación de primers Arch 20F / Arch 958R se usó para amplificar y cuantificar el gen SSU rRNA de archaea (DeLong, 1992).

**Tabla 2.** Secuencias y características de los primers utilizados para amplificar, clonar y cuantificar los genes *amoA* y SSU rRNA de bacteria y archaea a través de PCR en Tiempo-Real.

Organismo	Gen	Nombre del primer	*Secuencia 5'- 3'	Tipo	Tamaño producto PCR (bp)
<i>N. europaea</i>	<i>amoA</i>	<i>amoA</i> - 1F	GGGGTTTCTACTGGTGGT	Sentido	493
		<i>amoA</i> - 2R	CCCCTCKGSAAAGCCTTCTTC	Antisentido	
<i>E. coli</i>	SSU rRNA	BACT1369 F	CGGTGAATACGTTTCYCGG	Sentido	174
		PROK1541 R	AAGGAGGTGATCCRGCCGCA	Antisentido	
Archaea	<i>amoA</i>	<i>amoA</i> 19F	ATGGTCTGGCTWAGACG	Sentido	649
		<i>amoA</i> 643R	TCCCACTTWGACCARGCGGCCATCCA	Antisentido	
Archaea	SSU rRNA	Arch 20F	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	Sentido	918
		Arch 958R	YCCGGCGTTGAMTCCAATT	Antisentido	

\*K= G o T; S= G o C; Y= C o T; R= A o G; W= A o T

#### 6.4.2 Extracción y cuantificación del DNA de suelo

Para el análisis molecular se extrajo DNA de suelo usando el FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, Cat. # 6560-200). El DNA extraído se cuantificó con el método de fluorescencia usando el PicoGreen<sup>®</sup> dsDNA quantitation reagent (Molecular Probes, Cat. # P7581) y el equipo GENios (TECAN) y después visualizado en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio para determinar su calidad.

#### 6.4.3 Clonación de los genes de interés para la construcción de curvas estándar requeridas para la cuantificación de genes a través de PCR en Tiempo-Real.

El DNA de bacteria y archaea a clonarse se amplificó usando la Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Cat. # 11304-011) y su especificidad fue confirmada a través de visualización en geles de agarosa. Los productos de

PCR obtenidos usando las combinaciones de primers descritas anteriormente fueron purificados con el Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Cat. # A9281) y después se clonaron siguiendo las indicaciones del pGEM®-T Easy Vector System I Kit (Promega, Cat. # A1360). Los productos de PCR clonados corresponden a los genes *amoA* de *Nitrosomonas europaea*, *amoA* de AOA del suelo, SSU rRNA de *E. coli*, y SSU rRNA de archaea del suelo. Posteriormente se realizó la transformación usando células competentes *E. coli* DH5α a través del proceso de electroporación. Una vez identificados los clones recombinantes a través de selección positiva (colonias teñidas de color blanco) los clones positivos se purificaron usando el WIZARD®PLUS SV MINIPREPS DNA PURIFICATION SYSTEM (PROMEGA, Cat. # A1460), y el DNA del plásmido (pDNA) purificado se amplificó vía PCR y se visualizó en geles de agarosa para confirmar la presencia de los genes de interés. Los estándares requeridos para la cuantificación a través de PCR en Tiempo-Real se hicieron a partir de diluciones seriadas de una cantidad conocida del pDNA. Estos estándares se usaron como puntos de referencia para la determinación del número de copias de los genes de interés en las muestras bajo estudio. Las curvas estándar usando el pDNA se generaron con cuatro a siete órdenes de magnitud en un rango de  $0.9 \times 10^3$  a  $4.9 \times 10^9$  copias del gen de interés. Todas las reacciones de PCR en Tiempo-Real se realizaron en un termociclador DNA Engine OPTICON™2 Continuous Fluorescence Detector (MJ Research) y analizadas con el MJ OPTICON Monitor™ Analysis Software versión 3 (BIO-RAD).

#### 6.4.4 Genes de interés cuantificados a través de PCR en Tiempo-Real

El número de copias de cuatro genes de interés; i.e., gen Small-Subunit (SSU) ribosomal RNA (rRNA) de bacteria, gen amonía mono-oxigenasa (*amoA*) de bacterias amonía-oxidantes (AOB), gen SSU rRNA de archaeas, y gen *amoA* de archaeas amonía-oxidantes (AOA) fueron cuantificados a través de PCR en tiempo-real usando las combinaciones de primers descritas anteriormente.

El gen estructural *amoA* que codifica la subunidad activa de la enzima amonía mono-oxigenasa 1 se usó como marcador funcional para el análisis de poblaciones naturales de microorganismos amonía-oxidantes (Rotthauwe *et al.*, 1997) y para determinar el efecto de los exudados de las raíces en la actividad funcional de las AOB y AOA en términos de abundancia del gen *amoA* en estas poblaciones. Esta enzima está directamente involucrada en el proceso de la amonía oxidación (primera reacción del proceso de la nitrificación) ya que es producida por bacterias y archaeas amonía-oxidantes. Los genes SSU rRNA de bacteria y archaea se incluyeron en el análisis para monitorear los cambios en la población total de bacterias y archaeas cuando se ven sometidas a los compuestos liberados por las raíces, y de este modo determinar la especificidad de estos compuestos en los microorganismos amonía-oxidantes. Los genes SSU rRNA también se usaron para establecer indirectamente la predominancia de los genes *amoA* de las AOB y AOA dentro de la población total de bacterias y archaeas respectivamente.



Todos los genes en estudio se cuantificaron con el fluorocromo Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix (STRATAGENE, Cat. # 600548). Este fluorocromo emite fluorescencia a medida que los productos de PCR se acumulan dentro del tubo de reacción. Las reacciones de PCR en Tiempo-Real se corrieron independientemente por triplicado en un volumen de 20 µl con 20 ng de DNA de suelo, 0.5 µM de cada primer y 10 µl del Brilliant® SYBR® Green QPCR Master Mix. El control negativo o No Template Control (NTC) consistió de agua en vez de DNA. Las condiciones de amplificación de los genes de interés fueron las siguientes: 1) 95°C – 5 min; 2) 95 °C – 1.5 min; 3) 55 °C – 1.5 min; 4) 72 °C 1.5 min; 5) Lectura de la placa; 6) Incubar a 83 °C por 1 seg; 7) Lectura de la placa; 8) Ir al paso 2 por 40 veces más; 9) Curva de melting desde 65 °C hasta 95 °C, leer cada 0.2 °C, mantener 1 sec; Fin. La especificidad de los productos de PCR se confirmó a través del análisis de la curva de melting (curva de disociación) y visualización en geles de agarosa.

#### **6.4.5 Implementación y estandarización de metodología de la PCR en Tiempo-Real para determinar la actividad BNI en genotipos de *B. humidicola*.**

##### **6.4.5.1 Determinación de la reproducibilidad, especificidad y confiabilidad de la PCR en Tiempo-Real para estudiar la actividad BNI en genotipos de *B. humidicola* a través de la cuantificación de genes a partir de DNA de suelo.**

La determinación de la reproducibilidad, especificidad y confiabilidad de la PCR en Tiempo-Real se hizo a través de análisis de parámetros tales como gráficas de fluorescencia, gráficas del modelo de regresión lineal, curvas de melting o disociación. Adicionalmente se hizo una comparación de datos a nivel de Ciclo

umbral  $[C(t)]$ , eficiencias y número de copias del gen/reacción entre tres repeticiones técnicas de dos muestras contrastantes de DNA de suelo (suelo desnudo y *B. humidicola* 16888).

## 6.5 Procesamiento de los datos

Los datos crudos obtenidos del DNA Engine OPTICON™2 expresados en número de copias del gen/reacción de PCR en Tiempo-Real se convirtieron a número de copias del gen/g suelo seco con el fin de obtener datos más informativos y de fácil interpretación. Para realizar dicha conversión se realizó anticipadamente una corrección de los datos con base en el contenido de humedad gravimétrica del suelo presente en la muestra al momento de la colecta. El procedimiento utilizado para realizar la corrección y posterior conversión de los datos fue la siguiente:

D= peso del suelo seco

W= peso del suelo húmedo

MC= contenido de humedad

$MC = (W-D)/D$  (forma decimal del contenido de humedad)

Resolvemos la ecuación para peso seco:

$D = W/(MC+1)$

Reportamos contenido de humedad como porcentaje:

$MC(\%) = [(W-D)/D] * 100$

Resolvemos la ecuación para peso seco:

$D = W/[(MC/100)+1]$ ,

o usamos una ecuación alternativa:

$$D(g) = (W(g) * 100) / 100 + MC(\%)$$

Luego calculamos g suelo seco/reacción:

$$\text{Gramos de suelo seco/reacción} = [(D(g)/\text{vol. resuspensión DNA}) * \text{vol. DNA usado en la PCR}] / \text{Factor dilución DNA en la PCR}$$

Y después obtenemos las copias del gen/g suelo seco:

$$\text{Copias gen/g suelo seco} = \text{copias gen/reacción} / \text{gramos suelo seco/reacción.}$$

## 6.6 Análisis estadístico

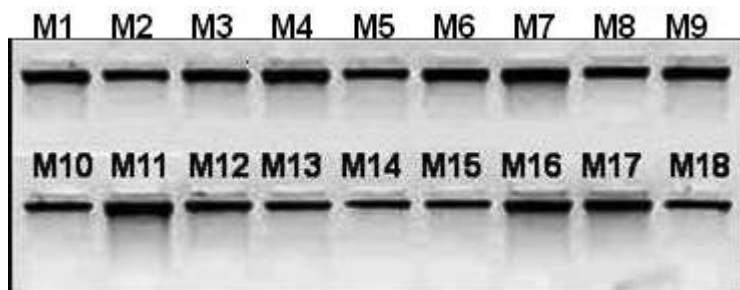
Previo a la inferencia estadística, el análisis de los datos moleculares expresados en Copias gen/g suelo seco se realizó con el programa SAS<sup>®</sup> v. 9.1.3 bajo una plataforma SunOS5.9 usando un ANOVA. La separación de medias se realizó posteriormente usando la prueba Ryan-Einot-Gabriel-Welsch Multiple Range Test con un nivel de significancia del 95% ( $\alpha = 0.05$ ).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Cuantificación de genes funcionales de microorganismos amonía-oxidantes del suelo a través de PCR en Tiempo-Real.

#### 7.1.1 Extracción y cuantificación del DNA de suelo

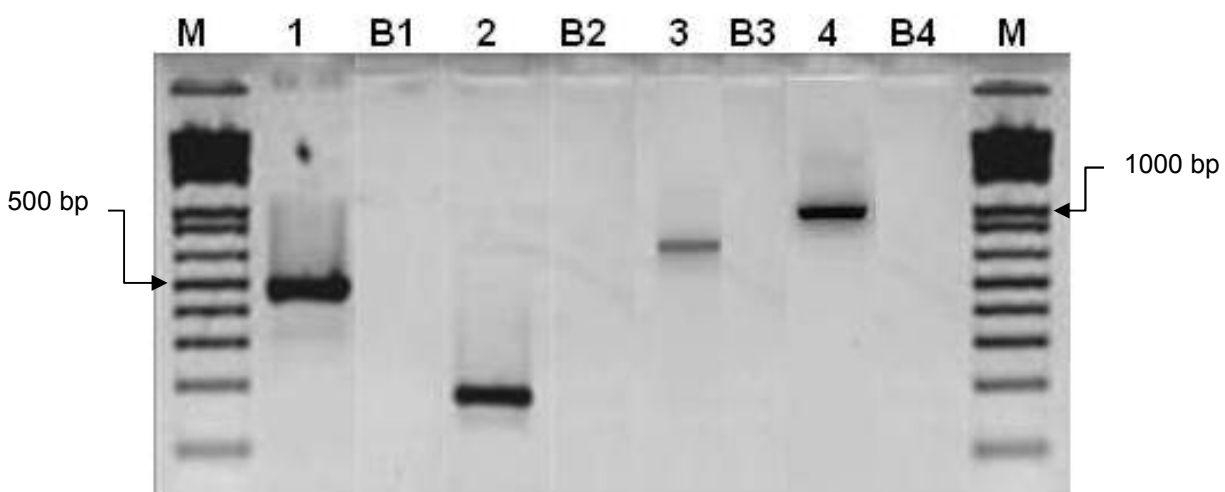
El DNA de suelo extraído con el FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil se cuantificó a través del método de fluorescencia obteniéndose concentraciones promedio en el rango de 68.81 a 740 ng DNA/ $\mu$ l por cada 0.5 g de suelo fresco. En todos los tiempos de cosecha de las muestras de suelo se obtuvo un DNA de buena calidad la cual fue determinada a través de visualización en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio. Resultados representativos de la calidad del DNA de suelo usado para el análisis molecular subsecuente se presentan en la Figura 3.



**Figura 3.** Gel de calidad del DNA de suelo usado en los análisis moleculares. Los DNAs visualizados se seleccionaron aleatoriamente y representan todas las épocas de cosecha de las muestras de suelo; i.e, 4<sup>to</sup> ciclo, 30 días después de la fertilización, 5<sup>to</sup> ciclo, 1 día antes de la fertilización, 1 y 30 días después de la fertilización. M1: Híbrido mulato (R1), M2: Suelo desnudo(R1), M3: *B. humicola* 679 (R1), M4: *B. humicola* 16888 (R1), M5: Híbrido mulato (R2), M6: *P. maximum* (R1), M7: *B. humicola* 679 (R2), M8: Soya(R1), M9: Híbrido mulato (R3), M10: Suelo desnudo (R2), M11: *B. humicola* 16888 (R2), M12: *P. maximum* (R2), M13: *B. humicola* 679 (R3), M14: Soya (R2), M15: Suelo desnudo (R3), M16: *B. humicola* 16888 (R3), M17: *P. maximum* (R3), M18: Soya (R3). M: muestra de DNA de suelo; R: repetición biológica.

### 7.1.2 Clonación de los genes de interés para la construcción de curvas estándar requeridas para la cuantificación de genes a través de PCR en Tiempo-Real.

La Figura 4 ilustra las bandas de los productos de PCR correspondientes a los genes de interés y los cuales fueron amplificados con la Platinum<sup>®</sup> Taq DNA Polymerase High Fidelity para después proceder con el proceso de clonación.



**Figura 4.** Visualización en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR de los genes de interés a ser clonados y usados en la construcción de curvas estándar para su cuantificación subsecuente a través de PCR en Tiempo-Real. M: marcador de tamaño molecular (1 Kb Plus DNA Ladder. Invitrogen, Cat. #10787-018), 1: gen *amoA* de *N. europaea* (493 bp), B1: blanco (agua) para el gen *amoA* de *N. europaea*, 2: gen SSU rRNA de *E. coli* (174 bp), B2: blanco (agua) para el gen SSU rRNA de *E. coli*, 3: gen *amoA* de archaea de suelo (649 bp), B3: blanco (agua) para el gen *amoA* de archaea de suelo, 4: gen SSU rRNA de archaea de suelo (918 bp), y B4: blanco para el gen SSU rRNA de archaea de suelo.

Una vez clonados y transformados los genes en mención se realizó una PCR convencional sobre tres colonias de bacterias teñidas de color blanco seleccionadas al azar y las cuales contenían potencialmente los genes de interés a cuantificarse. Los productos de PCR obtenidos se visualizaron en un gel de

agarosa al 1.5% obteniéndose el mismo patrón observado en la Figura 4. Este hecho confirmó que las colonias de bacterias seleccionadas eran positivas para los genes de interés y por consiguiente se procedió a purificar los plásmidos correspondientes para ser usados subsecuentemente como estándares para la cuantificación de los genes de interés a través de PCR en Tiempo-Real.

### **7.1.3 Cuantificación de los genes de interés a través de PCR en Tiempo-Real para estudiar la actividad de la inhibición biológica de la nitrificación en *B. humidicola*.**

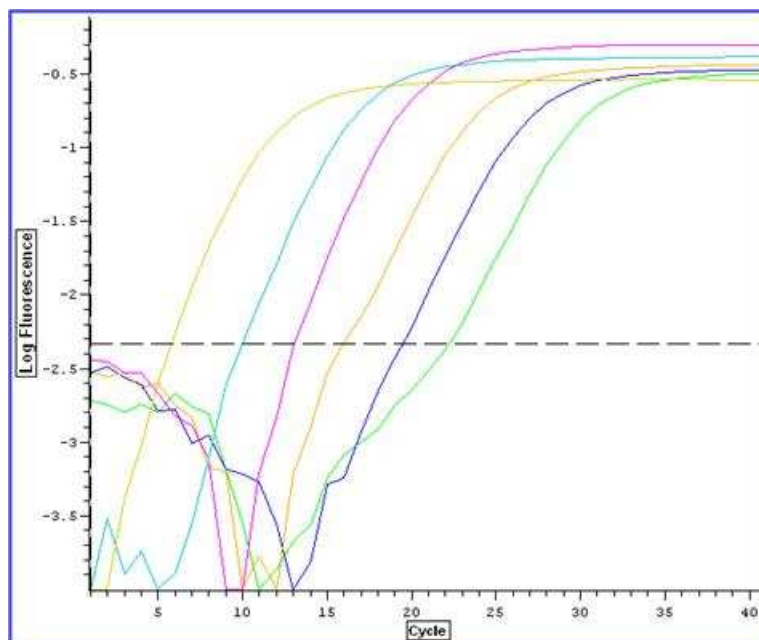
#### **7.1.3.1 Implementación y estandarización de metodología de la PCR en Tiempo-Real para determinar la actividad BNI en genotipos de *B. humidicola*.**

La metodología de la PCR en Tiempo-Real resultó ser la adecuada para cuantificar los genes de interés implicados en el proceso de la nitrificación en el suelo. Por consiguiente, esta técnica pudo ser implementada para estudiar la actividad BNI en genotipos de *B. humidicola* y en el futuro la misma se puede usar para extender este estudio a otros cultivos. La información que apoya esta asunción se basa en la obtención de curvas estándar lineales con  $R^2 > 0.980$  y eficiencias de amplificación entre 70 y 93% para todos los genes de interés cuantificados. Se obtuvieron curvas estándar (usando diluciones seriadas del pDNA de cada gen de interés) entre cuatro y siete órdenes de magnitud en el rango de  $0.9 \times 10^3$  a  $4.9 \times 10^9$  copias del pDNA. Adicionalmente, se obtuvo una buena reproducibilidad y consistencia entre las repeticiones técnicas de cada reacción de PCR en Tiempo-Real tal como se evidencia en las tablas subsecuentes y en particular en las gráficas de valores de  $C(t)$ .

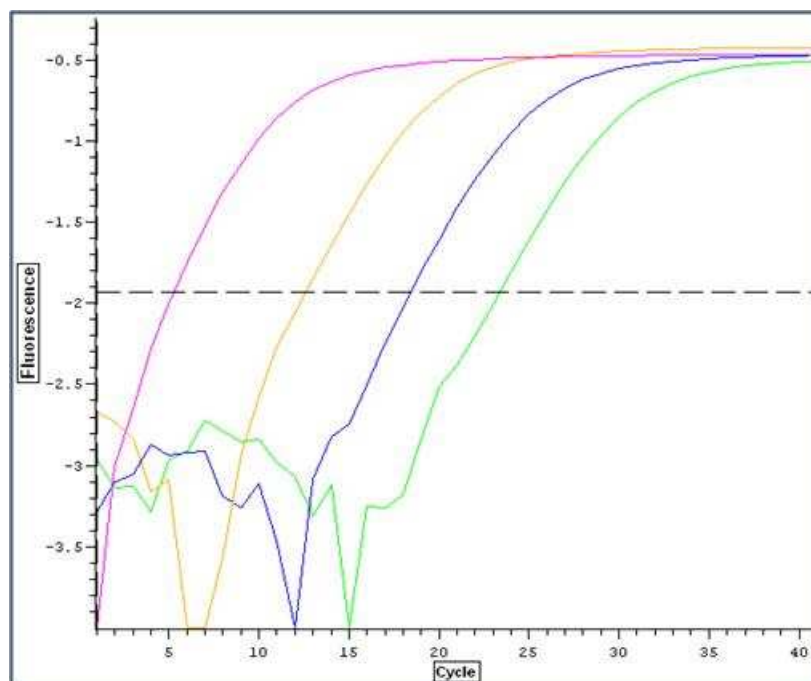
**7.1.3.1.1 Determinación de la reproducibilidad, especificidad, y confiabilidad de la PCR en Tiempo-Real para estudiar la actividad BNI en genotipos de *B. humidicola* a través de la cuantificación de genes a partir de DNA de suelo.**

Las figuras que se muestran a continuación muestran los resultados visuales de las gráficas de fluorescencia de las curvas estándar, las gráficas del modelo de regresión lineal de las curvas estándar para determinar el número de copias de los genes de interés en las muestras de DNA de suelo, y las curvas de melting o disociación las cuales determinan la especificidad de los productos de PCR obtenidos.

El análisis visual de las gráficas de fluorescencia de las curvas estándar nos demuestra si las diluciones seriadas de los estándares son apropiadas para la cuantificación subsecuente de los genes de interés. En términos generales, el rango de separación de las diluciones seriadas debe estar acorde al factor de dilución usado; en nuestro caso la separación o brecha de los estándares entre las diferentes diluciones seriadas es el adecuado tomando como referencia un factor de dilución de 10 entre cada dilución seriada (Figura 5 a Figura 8).

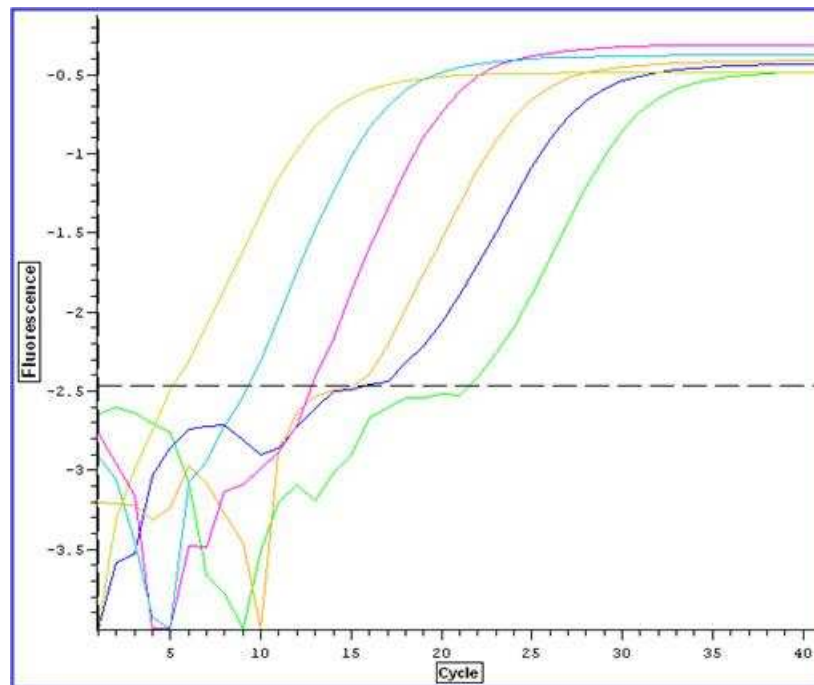


**Figura 5.** Gráfica de fluorescencia de la curva estándar del gen *amoA* de *N. europaea* construida a partir de seis diluciones seriadas de pDNA y usada como referencia para cuantificar el número de copias del gen *amoA* de AOB en muestras de DNA de suelo.

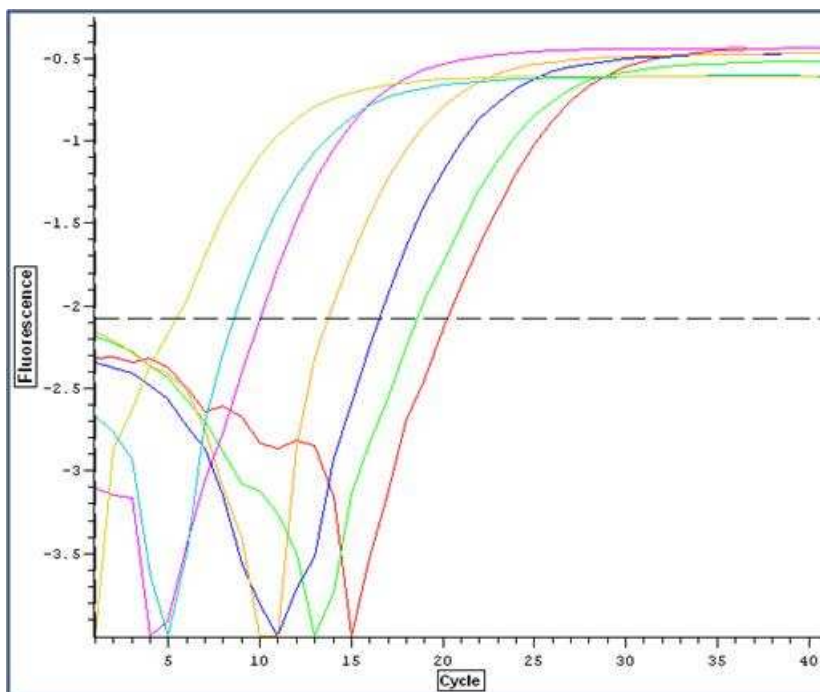


**Figura 6.** Gráfica de fluorescencia de la curva estándar del gen SSU rRNA de *E. coli* construida a partir de cuatro diluciones seriadas de pDNA y usada como referencia para cuantificar el número de copias del gen SSU rRNA de bacteria en muestras de DNA de suelo.



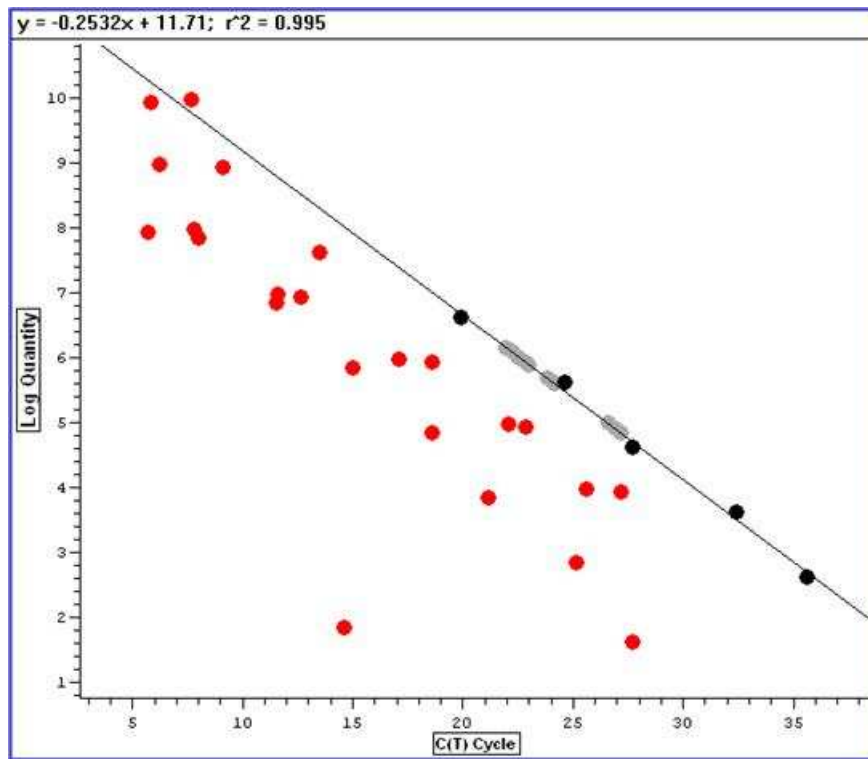


**Figura 7.** Gráfica de fluorescencia de la curva estándar del gen *amoA* de AOA de suelo construida a partir de seis diluciones seriadas de pDNA y usada como referencia para cuantificar el número de copias del gen *amoA* de AOA en muestras de DNA de suelo.

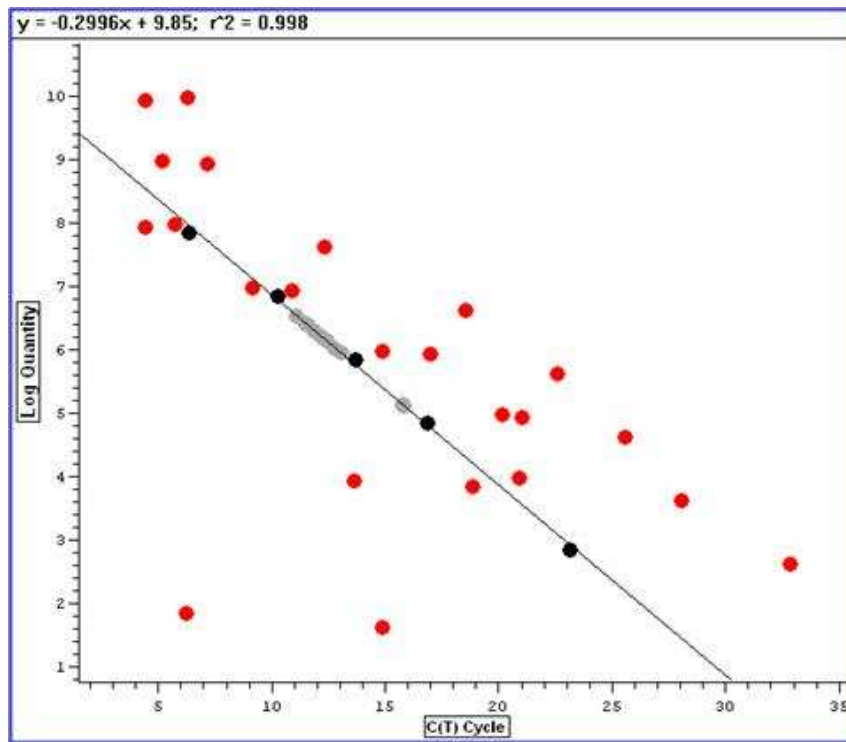


**Figura 8.** Gráfica de fluorescencia de la curva estándar del gen SSU rRNA de archaea de suelo construida a partir de siete diluciones seriadas de pDNA y usada como referencia para cuantificar el número de copias del gen SSU rRNA de archaea en muestras de DNA de suelo.

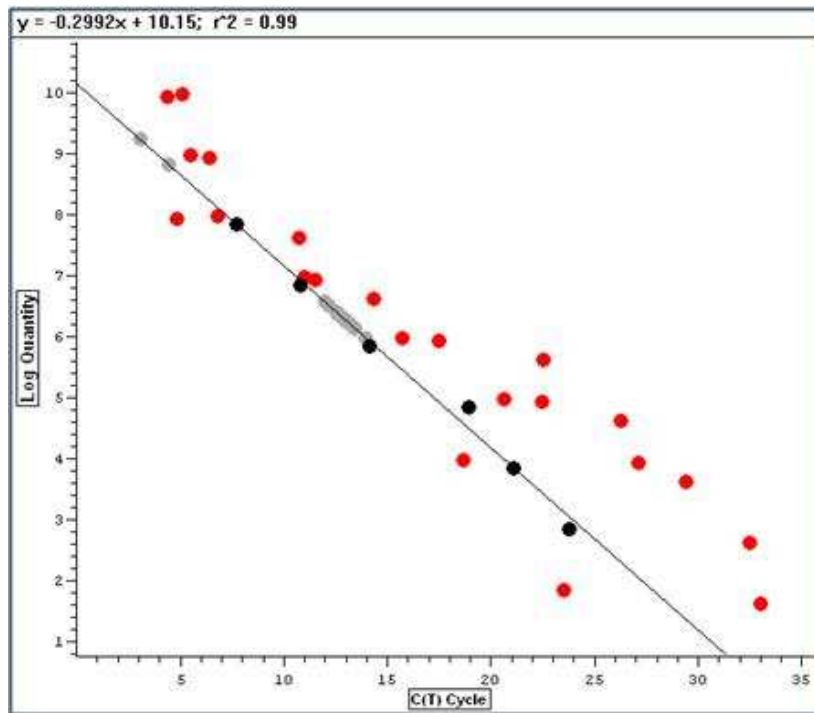
En cuanto a los modelos de regresión lineal, se obtuvieron valores de  $R^2$  mayores a 0.98 lo cual demuestra la confiabilidad del modelo de cuantificación. Así también en las gráficas de regresión se puede observar la ubicación de las muestras de interés a cuantificarse las cuales yacen entre los estándares (diluciones seriadas del pDNA) usados como referencia para la cuantificación de los genes de interés (Figura 9 a Figura 12).



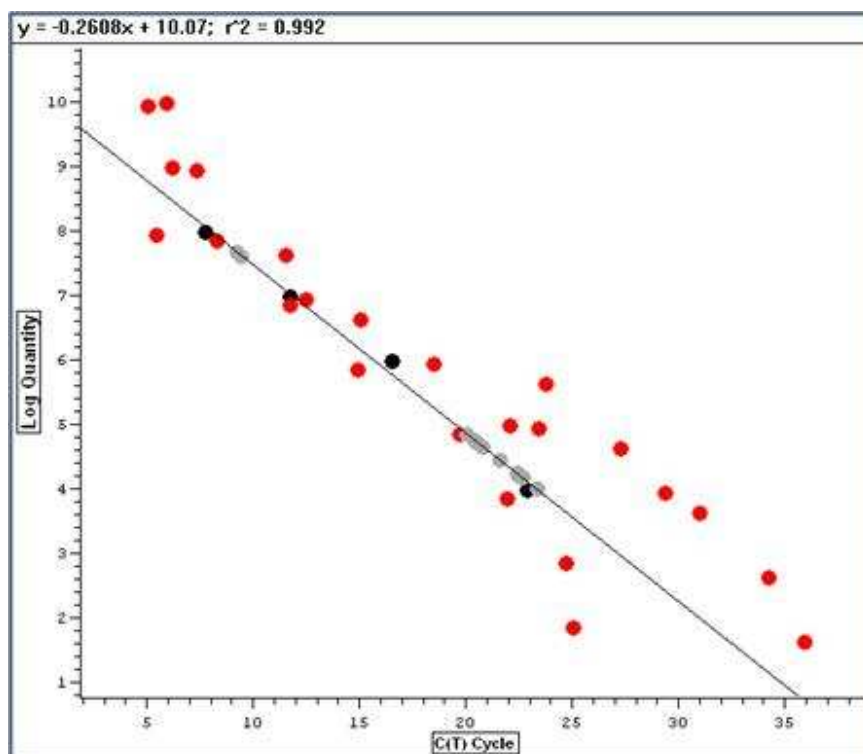
**Figura 9.** Gráfica y modelo de regresión de la curva estándar generada a partir de cinco diluciones seriadas de pDNA (gen *amoA* de *N. europaea*) para cuantificar el gen *amoA* en poblaciones de AOB del suelo. Puntos negros: diluciones seriadas del pDNA, Puntos grises: muestras de interés (DNA de suelo), Puntos rojos: diluciones seriadas correspondientes a las curvas estándar de los otros genes de interés. Modelo de regresión:  $Y = -0.2532X + 11.71$ ;  $R^2 = 0.995$



**Figura 10.** Gráfica y modelo de regresión de la curva estándar generada a partir de cinco diluciones seriadas de pDNA (gen SSU rRNA de *E. coli*) para cuantificar el gen SSU rRNA en poblaciones de bacterias del suelo. Puntos negros: diluciones seriadas del pDNA, Puntos grises: muestras de interés (DNA de suelo), Puntos rojos: diluciones seriadas correspondientes a las curvas estándar de los otros genes de interés. Modelo de regresión:  $Y = -0.2996X + 9.85$ ;  $R^2 = 0.998$

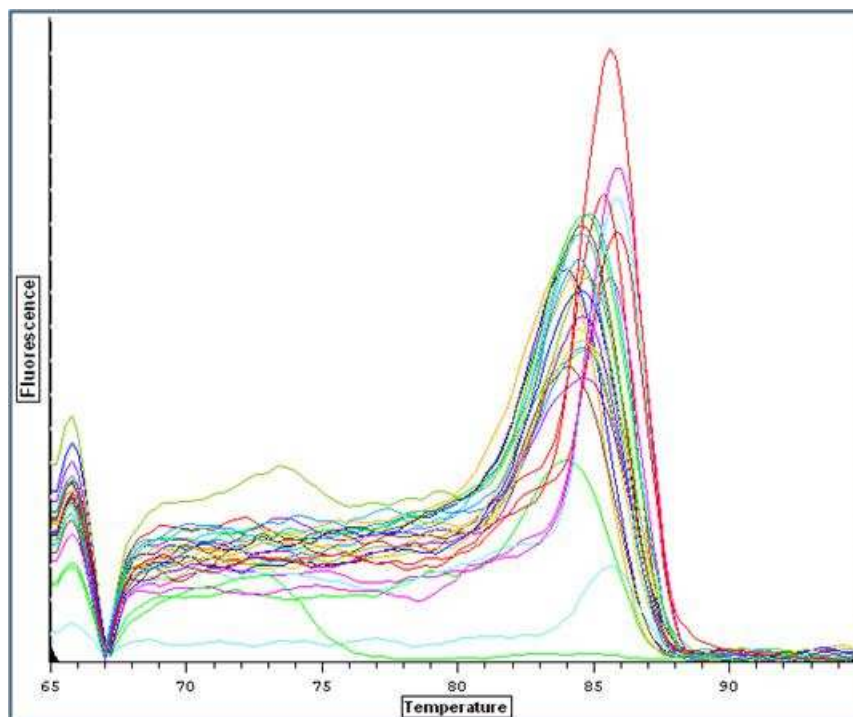


**Figura 11.** Gráfica y modelo de regresión de la curva estándar generada a partir de seis diluciones seriadas de pDNA (gen *amoA* de AOA de suelo) para cuantificar el gen *amoA* en poblaciones de AOA del suelo. Puntos negros: diluciones seriadas del pDNA, Puntos grises: muestras de interés (DNA de suelo), Puntos rojos: diluciones seriadas correspondientes a las curvas estándar de los otros genes de interés. Modelo de regresión:  $Y = -0.2992X + 10.15$ ;  $R^2 = 0.99$

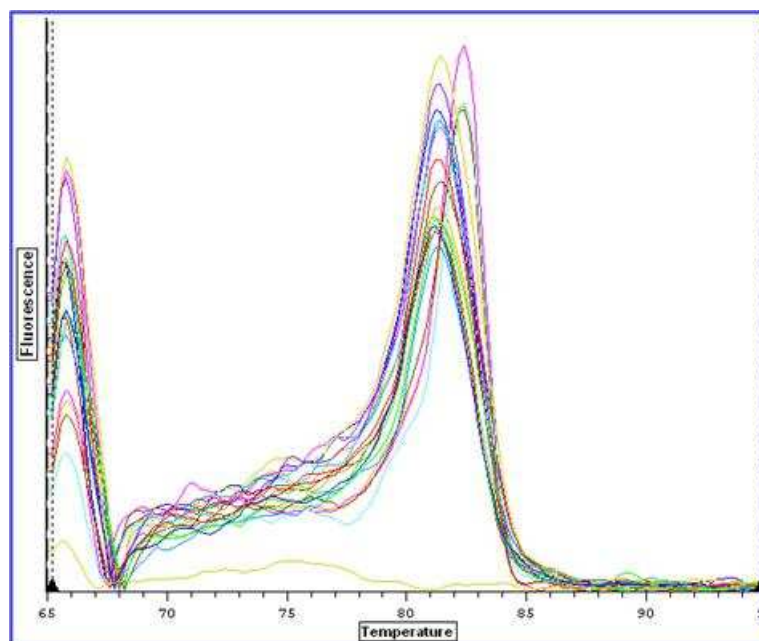


**Figura 12.** Gráfica y modelo de regresión de la curva estándar generada a partir de cuatro diluciones seriadas de pDNA (gen SSU rRNA de archaea de suelo) para cuantificar el gen SSU rRNA en poblaciones de archaea del suelo. Puntos negros: diluciones seriadas del pDNA, Puntos grises: muestras de interés (DNA de suelo), Puntos rojos: diluciones seriadas correspondientes a las curvas estándar de los otros genes de interés. Modelo de regresión:  $Y = -0.2608X + 10.07$ ;  $R^2 = 0.992$

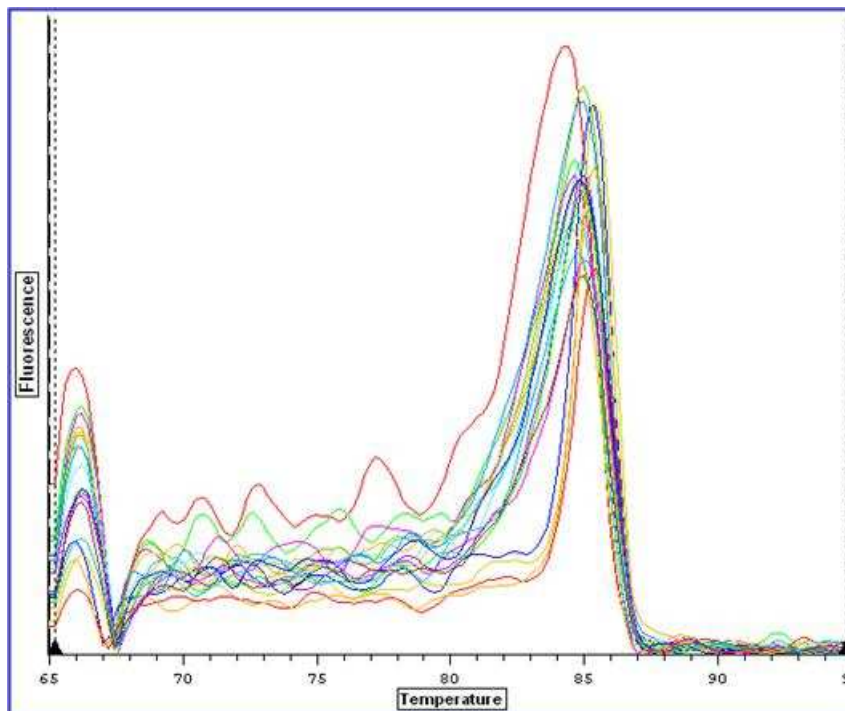
La curva de melting o disociación es un indicador directo de la especificidad de los productos de PCR que se generaron una vez concluidos los ciclos de amplificación del gen de interés. Por consiguiente, la especificidad se determina a través de la observación cualitativa de los picos de fluorescencia los cuales deben traslaparse. Esto indica que los productos de PCR obtenidos son disociados a una temperatura específica y por lo tanto los mismos corresponden únicamente al gen de interés (Figura 13 a Figura 16).



**Figura 13.** Curva de disociación de la curva estándar y muestras de DNA de suelo usadas para cuantificar el número de copias del gen *amoA* en poblaciones de AOB a través de PCR en Tiempo-Real.

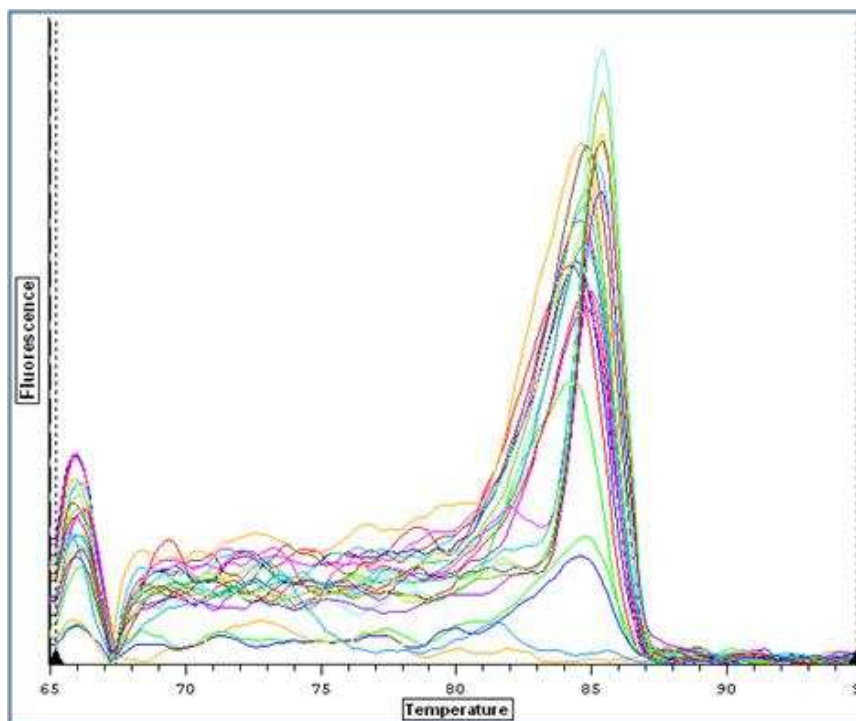


**Figura 14.** Curva de disociación de la curva estándar y muestras de DNA de suelo usadas para cuantificar el número de copias del gen SSU rRNA en poblaciones de bacterias del suelo a través de PCR en Tiempo-Real.



**Figura 15.** Curva de disociación de la curva estándar y muestras de DNA de suelo usadas para cuantificar el número de copias del gen *amoA* en poblaciones de AOA a través de PCR en Tiempo-Real.





**Figura 16.** Curva de disociación de la curva estándar y muestras de DNA de suelo usadas para cuantificar el número de copias del gen SSU rRNA en poblaciones de archaea de suelo a través de PCR en Tiempo-Real.

Por otra parte, las tablas 3 a 6 exhiben los datos obtenidos en términos de  $C(t)$ , eficiencia, y número de copias del gen de interés por reacción con su respectivo promedio y desviación estándar a partir de dos muestras contrastantes de DNA suelo (suelo desnudo y *B. humificans* 16888). Los datos de este análisis exploratorio demuestran la reproducibilidad de la PCR en Tiempo-Real para estudiar el fenómeno BNI usando DNA extraído de muestras de suelo ya que las diferencias numéricas observadas son bajas entre las repeticiones técnicas en términos de  $C(t)$ , eficiencia y número de copias del gen/reacción.

**Tabla 3.** Datos promedio de C(t), eficiencias y número de copias del gen/reacción obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen *amoA* de AOB en dos muestras contrastantes de suelo a través de PCR en Tiempo-Real.

Muestra DNA	C(t) <sup>a</sup>	Eficiencia <sup>b</sup> (%)	Copias gen/reacción <sup>c</sup>		
			Copias	Promedio	Desv. est.
Suelo desnudo R1	22.19	72.69	6.63E+05		
Suelo desnudo R2	22.40	80.82	5.95E+05	6.5E+05	5.6E+04
Suelo desnudo R3	22.06	72.04	7.06E+05		
<i>B. humidicola</i> 16888 R1	23.41	74.33	3.58E+05		
<i>B. humidicola</i> 16888 R2	22.87	70.36	4.69E+05	4.3E+05	6.0E+04
<i>B. humidicola</i> 16888 R3	22.94	82.63	4.54E+05		

<sup>a</sup>Ciclo umbral [C(t)] o punto de cruce: es el ciclo en el cual la curva de amplificación atraviesa el umbral. Es el ciclo donde se produce un incremento significativo detectable en la emisión de fluorescencia. <sup>b</sup>Eficiencia: Se estima a partir de la pendiente de la curva estándar. Denota el porcentaje de DNA que fue amplificado en cada ciclo. <sup>c</sup>Datos expresados en notación científica: E (exponente) =  $\times 10^n$

**Tabla 4.** Datos promedio de C(t), eficiencias y número de copias del gen/reacción obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen SSU rRNA de bacteria en dos muestras contrastantes de suelo a través de PCR en Tiempo-Real.

Muestra DNA	C(t) <sup>a</sup>	Eficiencia <sup>b</sup> (%)	Copias gen/reacción <sup>c</sup>		
			Copias	Promedio	Desv. est.
Suelo desnudo R1	12.46	91.99	1.31E+06		
Suelo desnudo R2	12.27	77.07	1.50E+06	1.6E+06	3.1E+05
Suelo desnudo R3	11.91	71.24	1.92E+06		
<i>B. humidicola</i> 16888 R1	15.76	86.81	1.35E+05		
<i>B. humidicola</i> 16888 R2	15.83	84.93	1.28E+05	1.3E+05	3.4E+03
<i>B. humidicola</i> 16888 R3	15.78	76.73	1.32E+05		

<sup>a</sup>Ciclo umbral [C(t)] o punto de cruce: es el ciclo en el cual la curva de amplificación atraviesa el umbral. Es el ciclo donde se produce un incremento significativo detectable en la emisión de fluorescencia. <sup>b</sup>Eficiencia: Se estima a partir de la pendiente de la curva estándar. Denota el porcentaje de DNA que fue amplificado en cada ciclo. <sup>c</sup>Datos expresados en notación científica: E (exponente) =  $\times 10^n$

**Tabla 5.** Datos promedio de C(t), eficiencias y número de copias del gen/reacción obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen *amoA* de AOA en dos muestras contrastantes de suelo a través de PCR en Tiempo-Real.

Muestra DNA	C(t) <sup>a</sup>	Eficiencia <sup>b</sup> (%)	Copias gen/reacción <sup>c</sup>		
			Copias	Promedio	Desv. est.
Suelo desnudo R1	19.61	72.48	1.28E+05		
Suelo desnudo R2	19.02	69.54	1.82E+05	1.7E+05	3.3E+04
Suelo desnudo R3	18.97	78.01	1.87E+05		
<i>B. humicola</i> 16888 R1	22.18	74.46	2.77E+04		
<i>B. humicola</i> 16888 R2	21.79	79.13	3.50E+04	3.4E+04	6.3E+03
<i>B. humicola</i> 16888 R3	21.56	71.16	4.02E+04		

<sup>a</sup>Ciclo umbral [C(t)] o punto de cruce: es el ciclo en el cual la curva de amplificación atraviesa el umbral. Es el ciclo donde se produce un incremento significativo detectable en la emisión de fluorescencia. <sup>b</sup>Eficiencia: Se estima a partir de la pendiente de la curva estándar. Denota el porcentaje de DNA que fue amplificado en cada ciclo. <sup>c</sup>Datos expresados en notación científica: E (exponente) =  $\times 10^n$

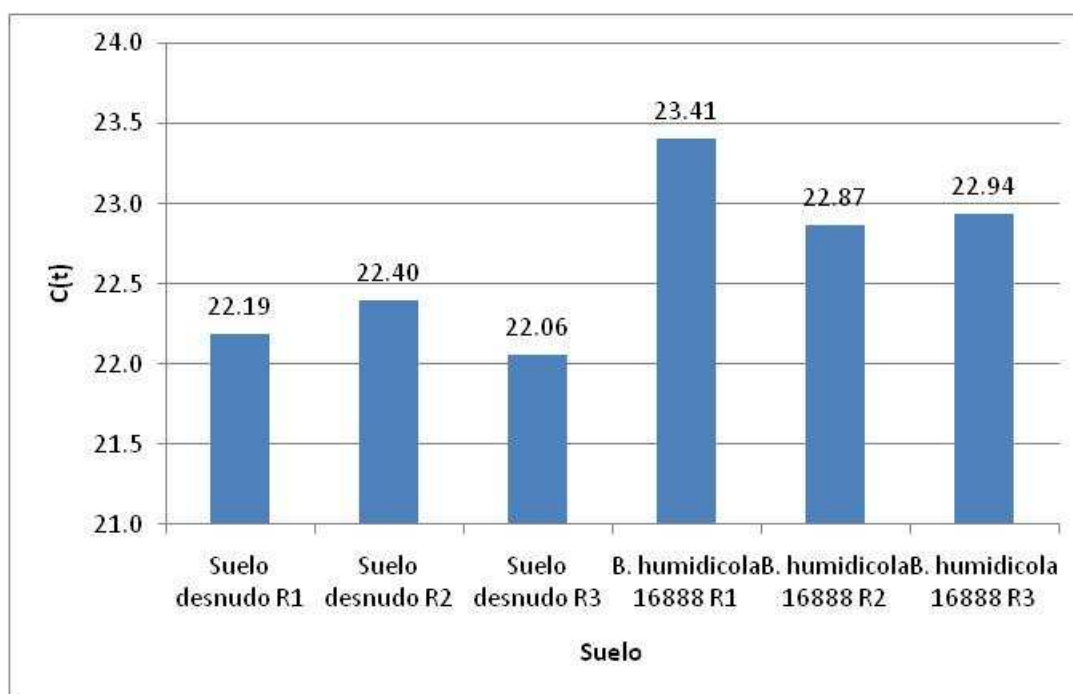
**Tabla 6.** Datos promedio de C(t), eficiencias y número de copias del gen/reacción obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen SSU rRNA de archaea en dos muestras contrastantes de suelo a través de PCR en Tiempo-Real.

Muestra DNA	C(t) <sup>a</sup>	Eficiencia <sup>b</sup> (%)	Copias gen/reacción <sup>c</sup>		
			Copias	Promedio	Desv. est.
Suelo desnudo R1	19.84	70.72	1.78E+07		
Suelo desnudo R2	19.76	91.90	1.86E+07	1.8E+07	3.7E+05
Suelo desnudo R3	19.81	74.13	1.81E+07		
<i>B. humicola</i> 16888 R1	23.55	72.91	2.77E+06		
<i>B. humicola</i> 16888 R2	24.05	70.06	2.16E+06	2.6E+06	3.7E+05
<i>B. humicola</i> 16888 R3	23.51	69.50	2.83E+06		

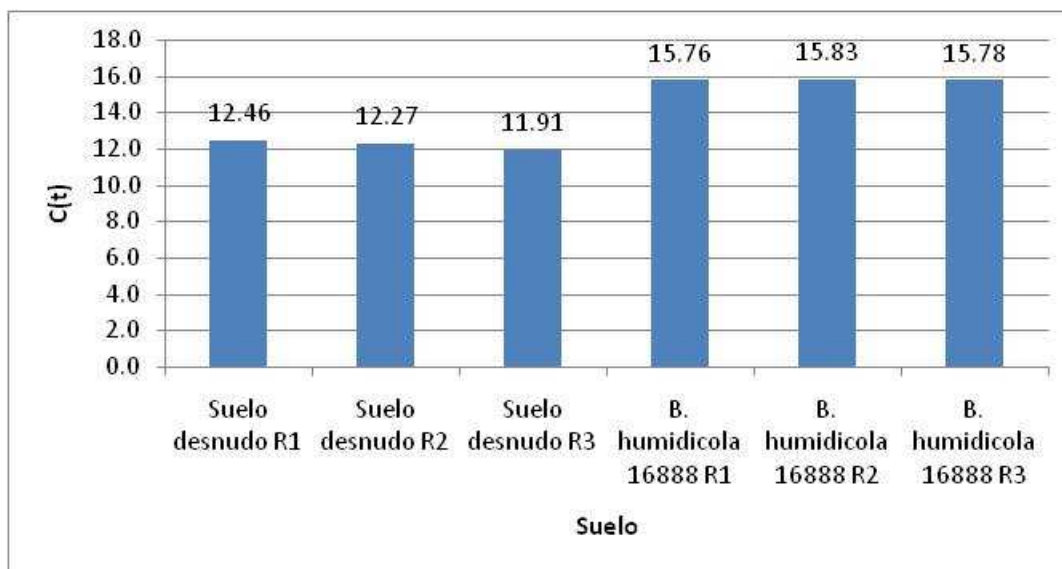
<sup>a</sup>Ciclo umbral [C(t)] o punto de cruce: es el ciclo en el cual la curva de amplificación atraviesa el umbral. Es el ciclo donde se produce un incremento significativo detectable en la emisión de fluorescencia. <sup>b</sup>Eficiencia: Se estima a partir de la pendiente de la curva estándar. Denota el porcentaje de DNA que fue amplificado en cada ciclo. <sup>c</sup>Datos expresados en notación científica: E (exponente) =  $\times 10^n$

Del mismo modo, los C(t) obtenidos en un grupo de tres repeticiones técnicas por reacción de PCR en Tiempo-Real para cada gen de interés confirman la

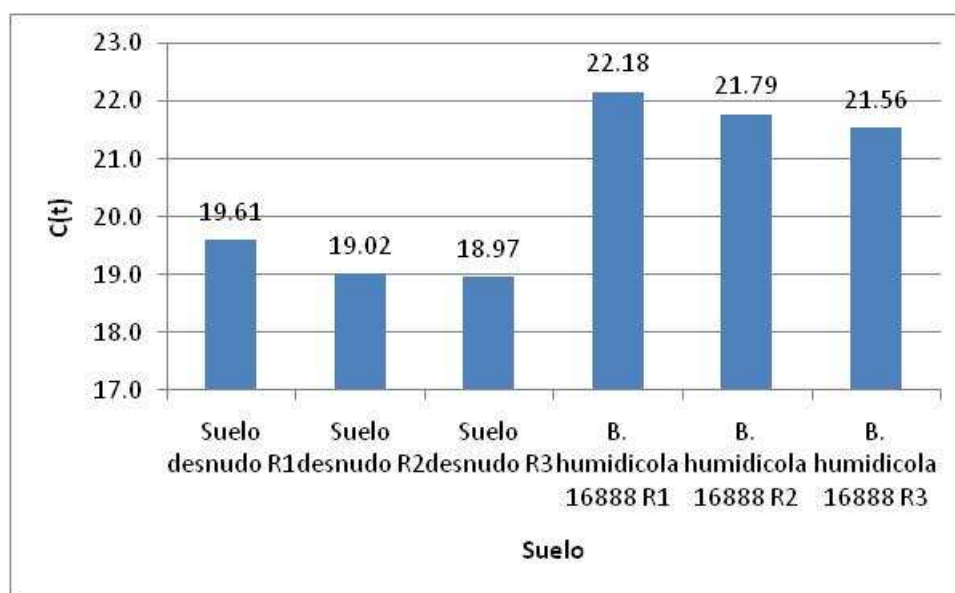
reproducibilidad de esta metodología al no presentar mayor variación entre tales repeticiones (Figura 17 a Figura 20). Es importante recalcar que en estudios que incluyen el uso de la PCR en Tiempo-Real, el  $C(t)$  es el ciclo en el cual la fluorescencia que acumulan los productos de PCR es detectada por primera vez, y por consiguiente es el parámetro usado para determinar la cantidad de DNA presente las muestras de interés a través de una interpolación con los valores obtenidos de la curva estándar. Por tal razón, este parámetro es vital en términos de reproducibilidad entre las repeticiones técnicas que se usen por reacción.



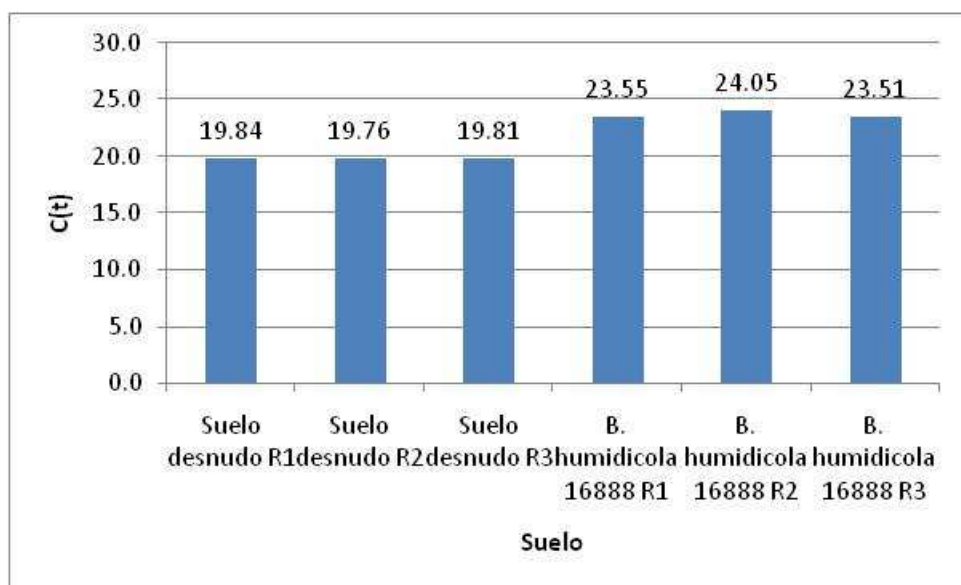
**Figura 17.** Reproducibilidad de la PCR en Tiempo-Real en términos de  $C(t)$  obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen *amoA* de AOB en dos muestras contrastantes de suelo.



**Figura 18.** Reproducibilidad de la PCR en Tiempo-Real en términos de  $C(t)$  obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen SSU rRNA de bacteria en dos muestras contrastantes de suelo.



**Figura 19.** Reproducibilidad de la PCR en Tiempo-Real en términos de  $C(t)$  obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen *amoA* de archaea en dos muestras contrastantes de suelo.



**Figura 20.** Reproducibilidad de la PCR en Tiempo-Real en términos de C(t) obtenidos de tres repeticiones técnicas al cuantificar el gen SSU rRNA de archaea en dos muestras contrastantes de suelo.

### 7.1.3.2 Cuantificación de genes en el 4<sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos.

#### 7.1.3.2.1 Cuantificación del gen SSU rRNA de bacteria y *amoA* de AOB en muestras de suelo colectadas en el 4<sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a 30 días después de la fertilización con sulfato de amonio.

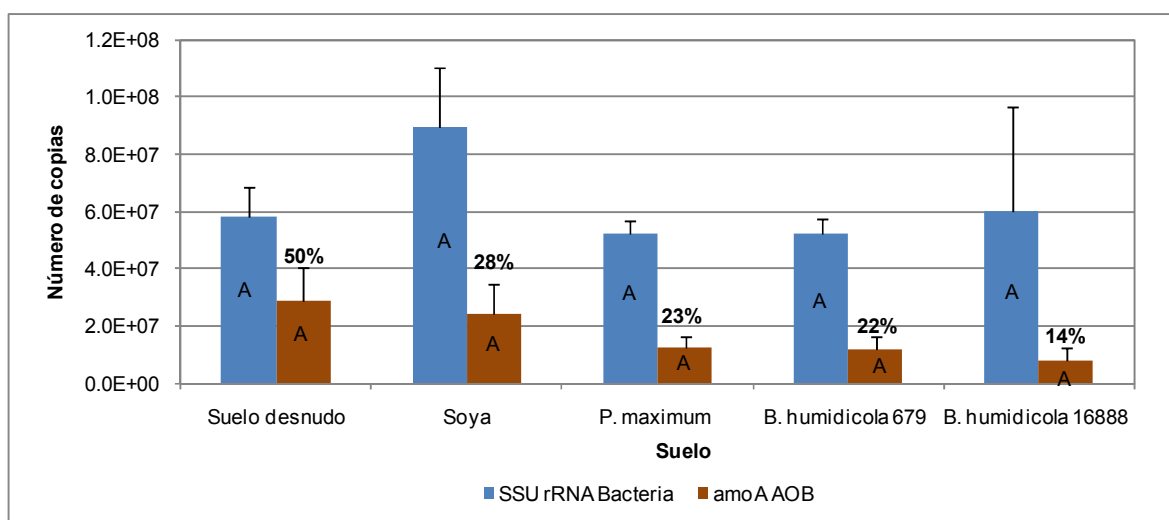
El gen SSU rRNA de bacteria cuantificado en este ciclo de crecimiento de los cultivos no mostró diferencias significativas a nivel estadístico ( $P \leq 0.05$ ) sugiriendo que el número inicial de estos genes se encontraban en una cantidad equitativa entre el suelo de las parcelas de los cultivos evaluados (Figura 21). Esta tendencia relativamente uniforme también indica la naturaleza específica del efecto inhibitorio de los exudados de las raíces hacia las poblaciones de AOB (Subbarao *et al.*, 2009). La alta variabilidad observada se justifica por el hecho de tratarse de

muestras ambientales las que por su naturaleza heterogénea muchas veces conllevan niveles altos de variabilidad.

No se observaron diferencias estadísticas significativas para el gen *amoA* de AOB en esta época de muestreo probablemente debido a la alta variabilidad obtenida. Este hecho puede deberse a los factores no controlables característicos de experimentos a nivel de campo de campo tales como pendiente, y heterogeneidad especial del suelo principalmente. Esto a su vez impide encontrar diferencias significativas entre los tratamientos. No obstante, se puede observar que la tendencia en términos de actividad BNI es la esperada, siendo *B. humicola* 16888 la especie que presenta la mayor actividad BNI y por consiguiente el menor número de copias del gen *amoA* de AOB, cuya cantidad es alrededor de tres veces menor que la de suelo desnudo y soya (Figura 21). Adicionalmente, se puede observar que a nivel de los pastos *P. maximum* mostró la menor actividad BNI en comparación con las *Brachiarias*, hallazgo que se complementa con el resultado reportado por Subbarao *et al.*, 2007a al determinar la actividad BNI a través del método de bioluminiscencia.

En esta época de muestreo en particular se evidencia el efecto acumulativo de los exudados de las raíces de los cultivos en el número de los genes *amoA* de AOB. Ya que no se ha suplido los cultivos con sulfato de amonio por 30 días, es probable que la actividad BNI observada en *B. humicola* 16888 se deba específicamente al tiempo considerado como efecto acumulativo de los exudados de las raíces sobre el número de copias del gen de interés.

Por otra parte, con base en el número de genes SSU rRNA y *amoA*, la población de AOB representa únicamente el 14% de la población total de bacterias en el suelo de *B. humidicola* 16888 (Figura 21). En suelo desnudo y soya la población de AOB representa el 50 y 28% respectivamente. Este hallazgo da evidencia de la especificidad y efectividad de los exudados de raíces de *B. humidicola* en inhibir la actividad amoníaco-oxidante de las poblaciones de AOB.



**Figura 21.** Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población de bacterias del suelo en el 4<sup>to</sup> ciclo de crecimiento a 30 días después de la fertilización al estimar el número de copias del gen SSU rRNA de bacteria y *amoA* de AOB a través de PCR en Tiempo-Real. Los datos se expresaron en número de copias del gen por g de suelo seco. Los valores mostrados son medias con sus respectivas desviaciones estándar calculadas a partir de tres repeticiones. Barras con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )

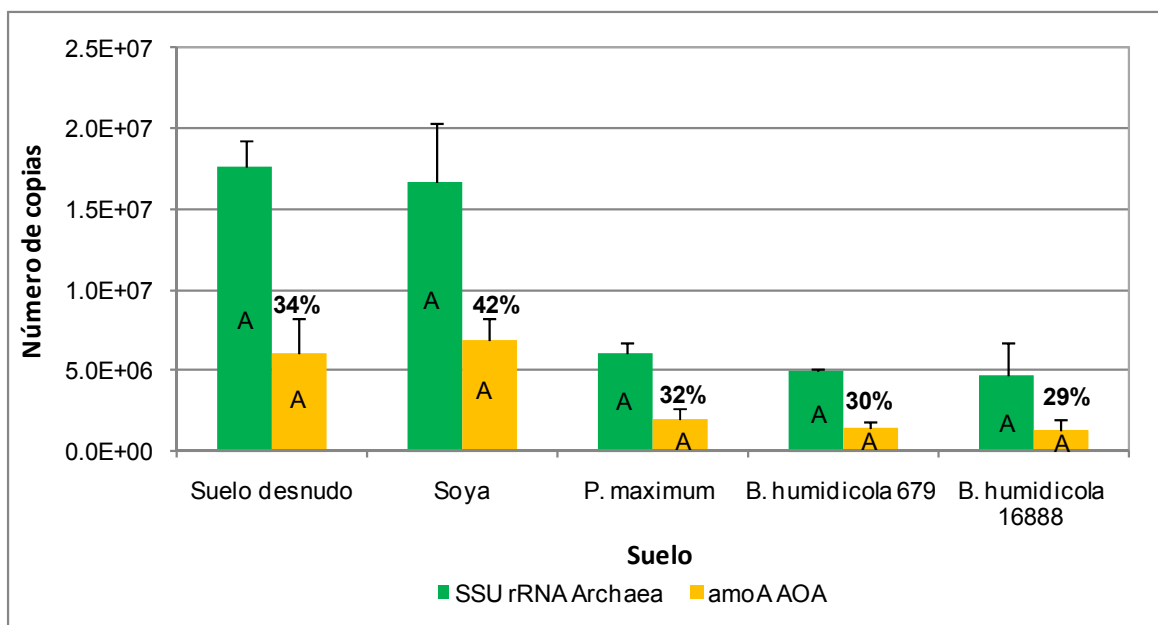


#### **7.1.3.2.2 Cuantificación del gen SSU rRNA de archaea y *amoA* de AOA en muestras de suelo colectadas en el 4<sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a 30 días después de la fertilización con sulfato de amonio.**

A diferencia de tendencia observada en el gen SSU rRNA de bacteria, el número de copias del gen SSU rRNA de archaea sí se vio afectado por los exudados de raíces de los cultivos. Esto sugiere que la población total de archaeas (expresada como número de copias del gen SSU rRNA) se ve probablemente suprimida por los exudados de las raíces de *Brachiaria* sp. y *Panicum maximum* (Figura 23). Esto a su vez podría indicar que los inhibidores producidos por las raíces de estos pastos no son enteramente específicos en su acción sobre las poblaciones de AOA (Subbarao *et al.*, 2009). Una explicación alternativa de la tendencia obtenida es que existe la posibilidad de que la población de AOA es significativamente abundante dentro de la población total de archaeas (Leininger *et al.*, 2006), y por tal razón este comportamiento se refleja en la disminución del número de copias del gen SSU rRNA principalmente en *Brachiaria* sp. y *Panicum máximo* en respuesta a los exudados de los raíces.

En el suelo de *B. humidicola* 16888, el 29% de la población total de archaeas son AOA en comparación con 34 y 42% en suelo desnudo y soya. A pesar de que el efecto de los exudados de raíces de los pastos suprimieron la población total de archaeas, el efecto inhibitorio específico de los exudados de *B. humidicola* sobre AOA es notable en comparación con suelo desnudo y soya (Figura 22).

Aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas la tendencia de inhibición o supresión por parte de los exudados de *Brachiaria* sp. es evidente en comparación con suelo desnudo y soya (Figura 22). La dificultad en encontrar diferencias a nivel estadístico radica nuevamente en las variables de campo que no son controlables tales como pendiente, humedad, sitios de alta actividad (hot spots), etc. Este hecho sumado a la naturaleza heterogénea temporal y espacial de muestras ambientales (suelo) podría ser el responsables de la alta variabilidad obtenida en el análisis estadístico y por lo tanto enmascarar los resultados observados. Sin embargo, es importante recalcar que la tendencia observada en términos número de copias del gen *amoA* de AOA por parte de *Brachiaria* sp es la esperada, obteniéndose el menor número en *B. humidicola* 16888. Esto confirma nuevamente la actividad BNI de *Brachiaria* sp. sobre las poblaciones de AOA.



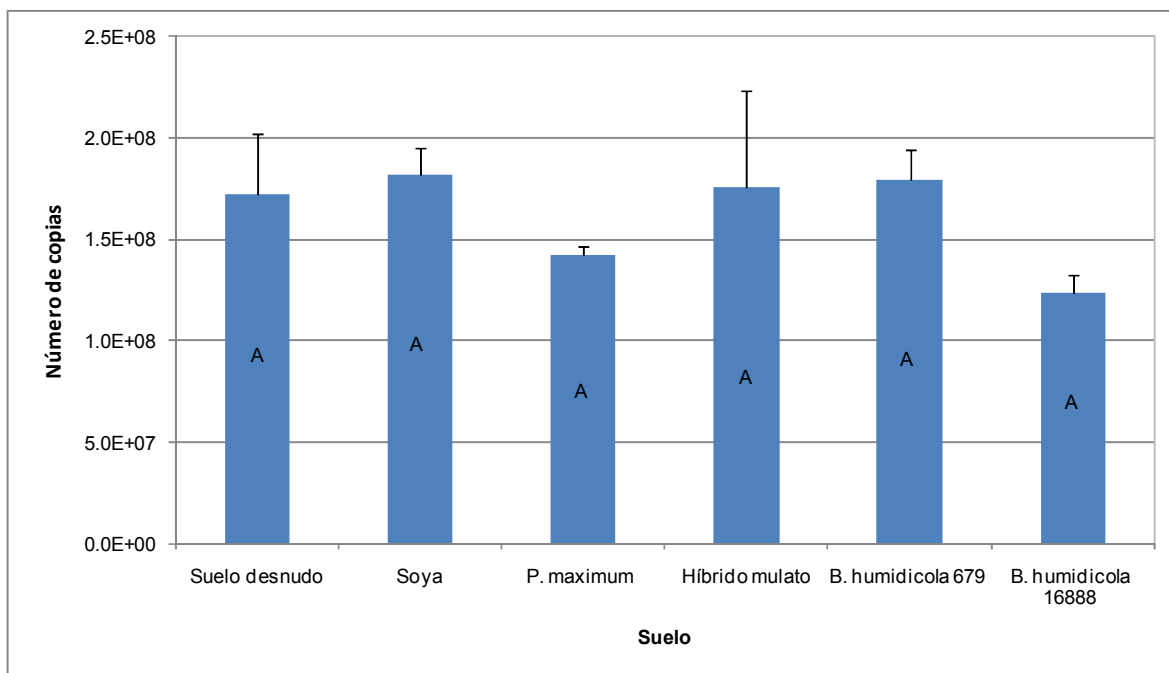
**Figura 22.** Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población archaeas del suelo en el 4<sup>to</sup> ciclo de crecimiento a 30 días después de la fertilización al estimar el número de copias del gen SSU rRNA de archaea y *amoA* de AOA a través de PCR en Tiempo-Real. Los datos se expresaron en número de copias del gen por g de suelo seco. Los valores mostrados son medias con sus respectivas desviaciones estándar calculadas a partir de tres repeticiones. Barras con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )

### 7.1.3.3 Cuantificación de genes en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos.

#### 7.1.3.3.1 Cuantificación del gen SSU rRNA de bacteria en muestras de suelo colectadas en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a un día después de la fertilización con sulfato de amonio.

A partir de esta época de muestreo se incluyó el genotipo *Brachiaria* híbrido cv. Mulato el cual no se incluyó en las épocas de muestreo anteriores debido a problemas técnicos. Como se observa en la Figura 23, hay un reducido efecto de los exudados de las raíces de los cultivos evaluados en la población total de bacterias (expresadas como número de copias del gen SSU rRNA). Esto se

evidencia en que no se encontraron diferencias significativas a nivel estadístico entre los tratamientos. Del mismo modo, se puede concluir que la población inicial de bacterias es uniforme entre los tratamientos evaluados lo cual permite que haya precisión en la cuantificación del gen *amoA* de AOB.

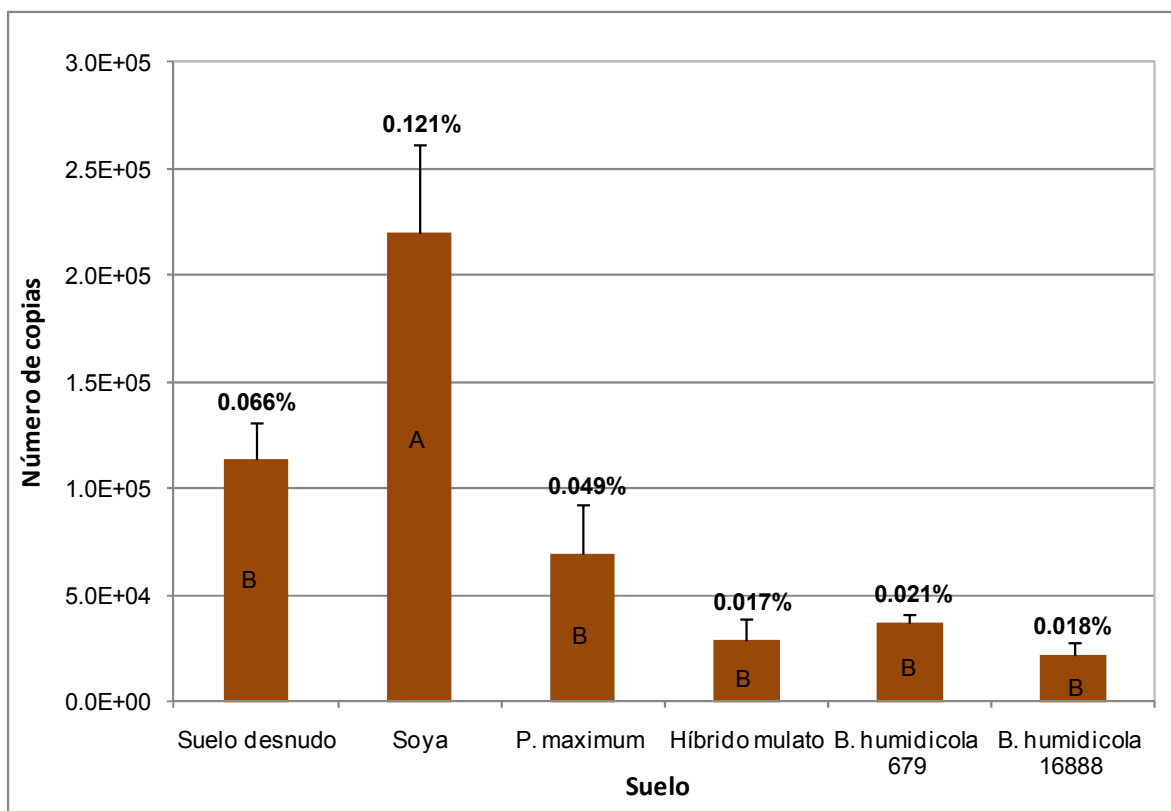


**Figura 23.** Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población de bacterias del suelo en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento a un día después de la fertilización al estimar el número de copias del gen SSU rRNA de bacteria a través de PCR en Tiempo-Real. Los datos se expresaron en número de copias del gen por g de suelo seco. Los valores mostrados son medias con sus respectivas desviaciones estándar calculadas a partir de tres repeticiones. Barras con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )

#### **7.1.3.3.2 Cuantificación del gen *amoA* de AOB en muestras de suelo colectadas en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a un día después de la fertilización con sulfato de amonio.**

Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, siendo las más importantes las observadas entre las parcelas de *B. humicola* 16888 y soya la cual posee más número de copias del gen *amoA* de AOB en aproximadamente 10 órdenes de magnitud en comparación con *B. humicola* 16888 (Figura 24). Esto permite inferir que *B. humicola* 16888 tiene la capacidad de inhibir o suprimir la nitrificación de una forma considerable al compararla con una especie estimulante de la nitrificación como lo es la soya.

Por otra parte, la fertilización con sulfato de amonio ejerció su efecto en la población de AOB la cual representó solamente el 0.018% de la población total de bacterias [expresadas en número de copias del gen SSU rRNA por g suelo seco] (Figura 24). Esto podría indicar que la aplicación de sulfato de amonio estimuló significativamente la liberación de compuestos BNI de las raíces de *B. humicola* lo que causó una disminución considerable de la población de AOB.

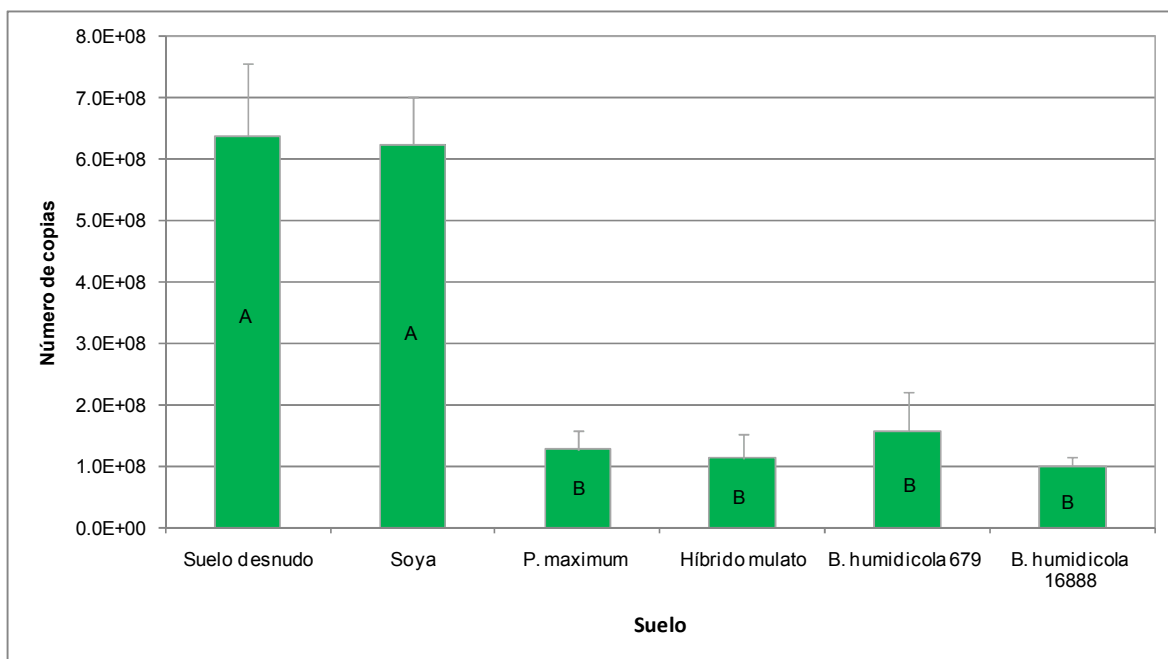


**Figura 24.** Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población de bacterias amonia-oxidantes (AOB) del suelo en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento a un día después de la fertilización al estimar el número de copias del gen *amoA* de AOB a través de PCR en Tiempo-Real. Los datos se expresaron en número de copias del gen por g de suelo seco. Los valores mostrados son medias con sus respectivas desviaciones estándar calculadas a partir de tres repeticiones. Barras con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )

#### 7.1.3.3.3 Cuantificación del gen SSU rRNA de archaea en muestras de suelo colectadas en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a un día después de la fertilización con sulfato de amonio.

Se obtuvo el menor número de genes SSU rRNA de archaea en el suelo de *B. humidicola* 16888 (Figura 25). Sin embargo, no existen diferencias significativas entre los suelos de los genotipos de *Brachiaria* sp. y *Panicum maximum*. Por otra parte, es clara la diferencia en el número de copias de genes SSU rRNA de

aproximadamente seis órdenes de magnitud entre los genotipos de *Brachiaria* sp. y *P. maximum* en comparación con las parcelas de soya y suelo desnudo. Al igual que en el 4<sup>to</sup> ciclo a 30 días después de la fertilización, en este muestreo se observa el efecto de los exudados de raíces, particularmente de *Brachiaria* sp. sobre la población total de archaeas expresada como número de copias del gen SSU rRNA. Este hecho puede atribuirse una vez más a que la población total de archaeas se ve suprimida por el efecto de los exudados de *Brachiaria* sp., o alternativamente a que el número de copias de genes *amoA* de AOA es supremamente abundante dentro de la población total de archaeas. Por lo tanto, esto hace que el efecto de los exudados de *Brachiaria* sp. se refleje en una disminución significativa de la abundancia de genes SSU rRNA de archaea.



**Figura 25.** Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población de archaeas del suelo en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento a un día después de la fertilización al estimar el número de copias del gen SSU rRNA de archaea a través de PCR en Tiempo-Real. Los datos se expresaron en número de copias del gen por g de suelo seco. Los valores mostrados son medias con sus respectivas desviaciones estándar calculadas a partir de tres repeticiones. Barras con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )

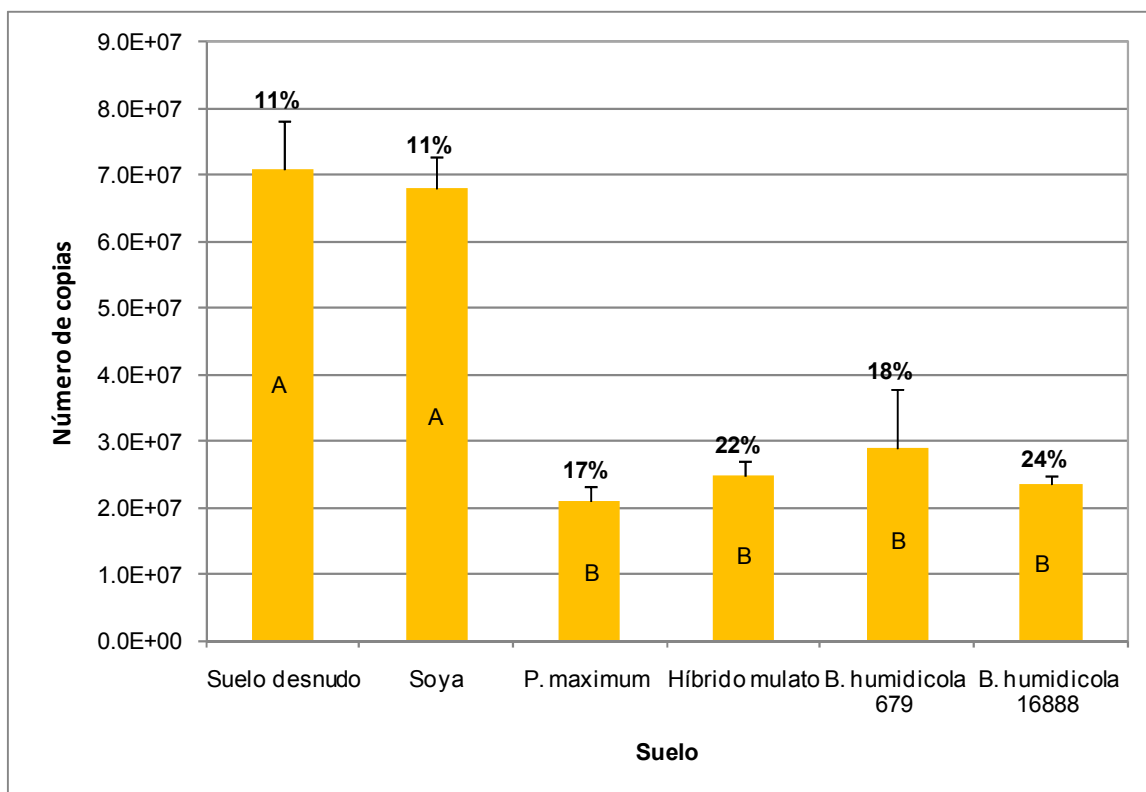
#### 7.1.3.3.4 Cuantificación del gen *amoA* de AOA en muestras de suelo colectadas en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a un día después de la fertilización con sulfato de amonio.

El número de genes *amoA* de AOA de *Brachiaria* sp. es más de dos veces superior al observado en suelo desnudo y soya (Figura 26). Este hecho evidencia que los exudados de las raíces del genotipo *B. humidicola* 16888 principalmente están suprimiendo o inhibiendo de forma significativa la población de AOA, lo cual a la vez sugiere que este genotipo posee una actividad BNI considerable.



Así también es claro que el número de copias del gen *amoA* de AOA es alrededor de 1000 veces mayor que el observado en las AOB si consideramos únicamente el valor reportado para *B. humdicola* 16888 (Figura 24). Este hallazgo es consistente con resultados publicados que establecen que las AOA son mucho más abundantes que sus contrapartes AOB en ecosistemas terrestres (Leininger *et al.*, 2006).

Aunque el mayor porcentaje de AOA dentro de la población total de archaeas se observó en *B. humdicola* 16888, el efecto de los exudados de este pasto sobre la población de AOA (expresada en número de genes *amoA*) es una de las mayores en su efecto inhibitorio sobre los genes *amoA* en comparación con suelo desnudo y soya (Figura 26). Esta tendencia confirma la alta actividad BNI por parte de *B. humdicola*.



**Figura 26.** Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población de archaeas amonia-oxidantes (AOA) del suelo en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento a un día después de la fertilización al estimar el número de copias del gen *amoA* de AOA través de PCR en Tiempo-Real. Los datos se expresaron en número de copias del gen por g de suelo seco. Los valores mostrados son medias con sus respectivas desviaciones estándar calculadas a partir de tres repeticiones. Barras con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )

#### 7.1.3.3.5 Efecto de la fertilización con sulfato de amonio en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a un día después de la fertilización.

El incremento del número de genes *amoA* de AOA se debe muy probablemente al efecto de la fertilización con sulfato de amonio ya que éste representa la principal fuente de alimento de los microorganismos amonia-oxidantes (Okano *et al.*, 2004). Este incremento, sin embargo, fue más notable en los genes *amoA* de AOA ya

que éstas son mucho más abundantes que las AOB como se mencionó anteriormente.

El efecto de la fertilización en el incremento de los genes *amoA* de AOA es evidente si confrontamos el número de genes obtenidos en el 4<sup>to</sup> ciclo a 30 días después de la fertilización y el obtenido en el 5<sup>to</sup> ciclo a 1 día después de la fertilización. Para el caso particular de *B. humidicola* 679 y *B. humidicola* 16888 el número de genes *amoA* de AOA se incrementaron en 20 y 17 órdenes de magnitud respectivamente en respuesta a la aplicación de sulfato de amonio. (Tabla 7). Una tendencia similar se observó en el gen SSU rRNA de archaea. Sin embargo, tal como se observó en las gráficas del 5<sup>to</sup> ciclo a 1 día después de la fertilización, la actividad BNI de *B. humidicola* no se vio afectada por la aplicación del fertilizante. Esto sugiere que el sulfato de amonio juega un papel importante en estimular y mantener la actividad BNI en *B. humidicola* independientemente del incremento del número de genes *amoA* de AOA en respuesta a la presencia de sulfato de amonio en el suelo. Por otra parte, también se observó un incremento en el número de genes de SSU rRNA de bacteria (entre 2 y 3 órdenes de magnitud) en respuesta a la aplicación del fertilizante. No obstante, este incremento no fue tan significativo como lo observado en el gen *amoA* de AOA y SSU rRNA de archaea.

La fertilización con sulfato de amonio también estimuló y mantuvo la actividad BNI de los exudados de las raíces de *B. humidicola* independientemente de las variaciones en el número de copias del gen *amoA* de AOB y AOA tal como

muestran las gráficas del 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento a 1 día después de la fertilización. *B. humidicola* 16888 exhibió una actividad BNI alta (número reducido de genes *amoA*) en comparación a suelo desnudo y soya a pesar del incremento del número de copias del gen *amoA* de AOA en relación con el gen *amoA* de AOB. El gen *amoA* de AOB contrariamente disminuyó en 370 veces para el caso de *B. humidicola* 16888, y 254 y 111 veces para suelo desnudo y soya, respectivamente, en respuesta a la fertilización con sulfato de amonio. Este comportamiento se debe probablemente a que la estimulación de la actividad BNI en *B. humidicola* por parte del sulfato de amonio es más efectiva sobre la población de AOB. Alternativamente podrían existir ciertos factores químicos del suelo ,que junto con la aplicación del fertilizante, afectaron el tamaño poblacional de las AOB en todos los tratamientos.

**Tabla 7.** Variación en el número de microorganismos del suelo en respuesta a la fertilización con sulfato de amonio al comparar el 4<sup>to</sup> y 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a 30 días y un día después de la fertilización respectivamente.

Tratamiento - Cultivo	SSU rRNA Bacteria	<i>amoA</i> AOB	SSU rRNA Archaea	<i>amoA</i> AOA
Suelo desnudo	3	-254	36	12
Soya	2	-111	37	10
<i>P. maximum</i>	3	-176	21	11
<i>B. humidicola</i> 679	3	-316	31	20
<i>B. humidicola</i> 16888	2	-370	21	17

Las poblaciones de microorganismos se expresaron en número de copias del gen por g de suelo seco y fueron cuantificados a través de PCR en Tiempo-Real

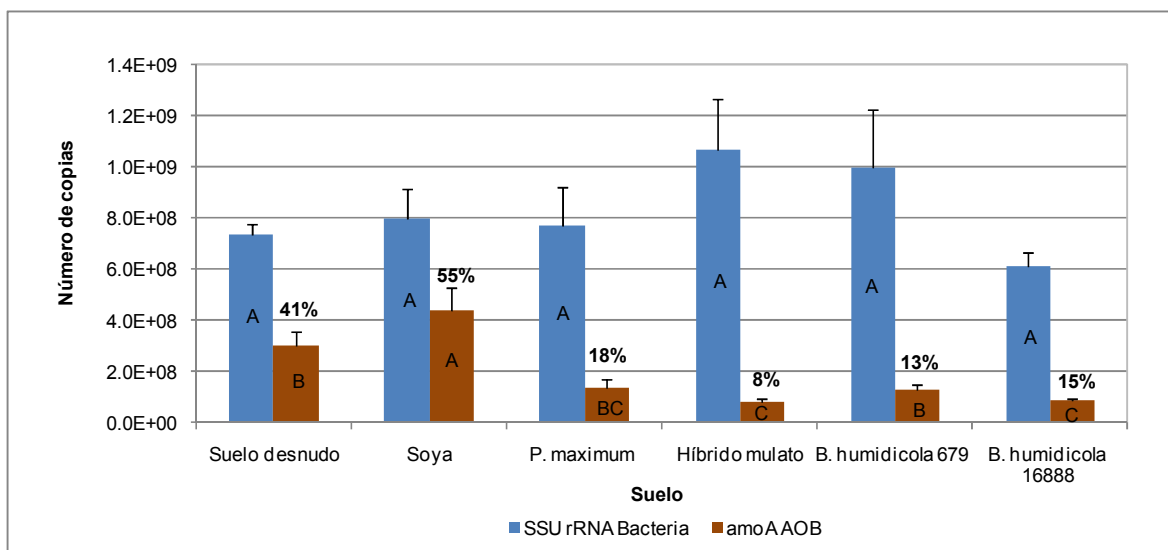
#### **7.1.3.3.6 Cuantificación del gen SSU rRNA de bacteria y *amoA* de AOB en muestras de suelo colectadas en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a 30 días después de la fertilización con sulfato de amonio.**

En esta época de muestreo se observa que no existen diferencias estadísticas significativas entre las parcelas de las especies evaluadas en lo que respecta al número de copias del gen SSU rRNA de bacteria (Figura 27). Tal como en las épocas de muestreo anteriores la tendencia observada demuestra que el efecto de los exudados de las raíces de las especies evaluadas no afecta la población total de bacterias del suelo (expresada en número de copias de gen SSU rRNA). Esto evidencia que los exudados de las raíces tienen un efecto inhibitorio sobre un grupo específico de bacterias del suelo. La tendencia observada adicionalmente sugiere que la cantidad inicial de los genes SSU rRNA de bacteria es constante entre las parcelas de las especies evaluadas. Esto indica a su vez que al cuantificar los genes *amoA* de AOB se elimina la posibilidad de una sub o sobreestimación ya que se cuenta con una cantidad uniforme de genes SSU rRNA bacterianos en todas las parcelas de las especies evaluadas.

La especie híbrido mulato mostró el menos número de copias del gen *amoA* de AOB aunque el mismo no fue estadísticamente diferente de *B. humidicola* 16888 y *P. maximum* (Figura 30). *P. maximum* no es estadísticamente diferente de suelo desnudo y *B. humidicola* 679 a pesar de que la cantidad de genes del primero duplica al segundo. Este hallazgo, sin embargo, implica que los genotipos de *B. humidicola* presentan actividad BNI en comparación con los controles (suelo desnudo y soya).

Por otra parte, el efecto del tiempo (efecto acumulativo de la liberación de los exudados de las raíces) es claro en esta época de muestreo ya que hubo un aumento en la cantidad del número de copias del gen *amoA* de AOB en tres órdenes de magnitud en comparación con el 5<sup>to</sup> ciclo, 1 día después de la fertilización (Figura 24). A pesar de que el número de copias del gen *amoA* de AOB se incrementó notablemente en todas las parcelas de las especies evaluadas, la tendencia de la actividad BNI se mantiene siendo las especies de *B. humdicola* las que presentan la mayor actividad (menor número de copias del gen *amoA* de AOB).

Los genes *amoA* en el suelo de *B. humdicola* 16888 solo representaron el 15% de la población total de bacterias en comparación con el 41% encontrado en suelo desnudo y el 55% encontrado en soya (Figura 27). Esto refleja la naturaleza específica de los exudados de *B. humdicola* en inhibir o suprimir la actividad enzimática de las AOB en términos de amonía-oxidación.

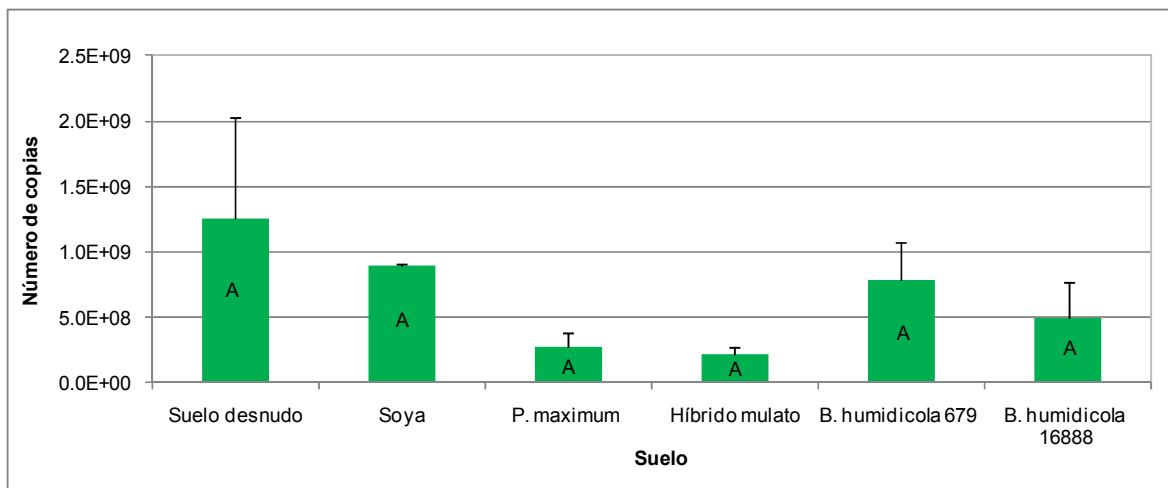


**Figura 27.** Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población de bacterias del suelo en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento a 30 días después de la fertilización al estimar el número de copias del gen SSU rRNA de bacteria y *amoA* de AOB a través de PCR en Tiempo-Real. Los datos se expresaron en número de copias del gen por g de suelo seco. Los valores mostrados son medias con sus respectivas desviaciones estándar calculadas a partir de tres repeticiones. Barras con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ )

#### 7.1.3.3.7 Cuantificación del gen SSU rRNA de archaea en muestras de suelo colectadas en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a 30 días después de la fertilización con sulfato de amonio.

En la Figura 28 se observa que híbrido mulato presentó el menor número de copias del gen SSU rRNA de archaea. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas a nivel estadísticos entre las parcelas de los tratamientos evaluados. Del mismo modo, en este muestreo no se obtuvo la tendencia esperada en términos de actividad BNI pues el genotipo *B. humidicola* 679 presenta casi la misma cantidad de genes que soya, y además esta cantidad es notablemente superior a la observada en *B. humidicola* 16888, híbrido mulato y *Panicum*

*maximum*. Se puede atribuir este hecho nuevamente a la influencia de las variables topográficas del suelo, principalmente la pendiente, lo cual probablemente fue la causa de la tendencia inusual obtenida en esta época de muestreo.



**Figura 28.** Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población archaeas del suelo en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento a 30 días después de la fertilización al estimar el número de copias del gen SSU rRNA de archaea a través de PCR en Tiempo-Real. Los datos se expresaron en número de copias del gen por g de suelo seco. Los valores mostrados son medias con sus respectivas desviaciones estándar calculadas a partir de tres repeticiones. Barras con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

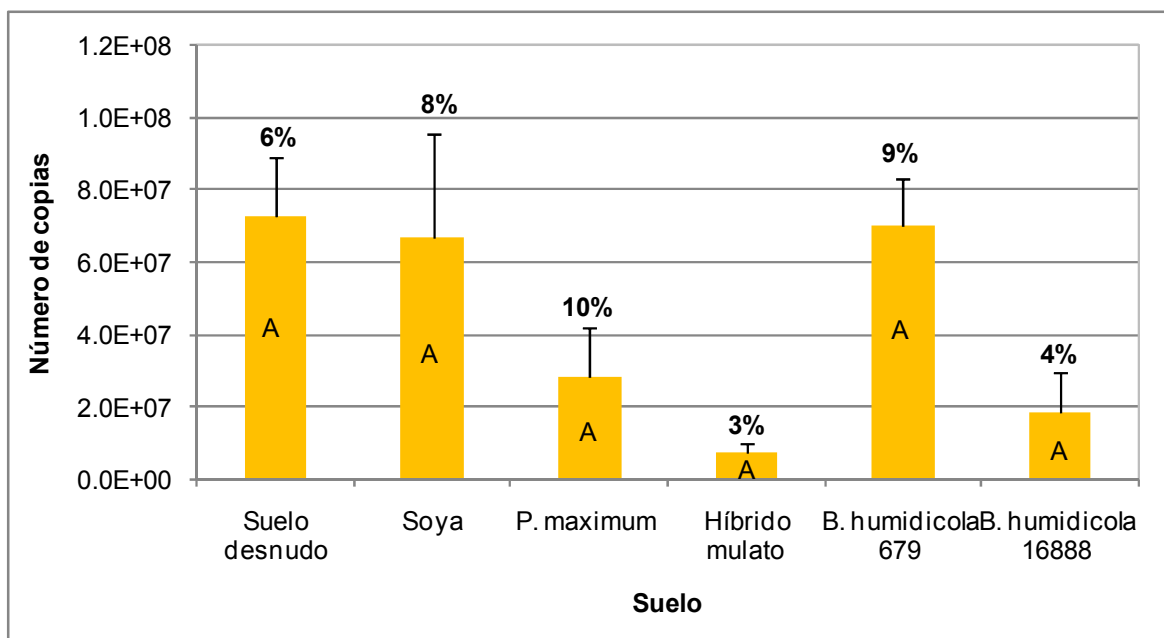
#### 7.1.3.3.8 Cuantificación del gen *amoA* de AOA en muestras de suelo colectadas en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a 30 días después de la fertilización con sulfato de amonio.

Híbrido mulato mostró el menor número de genes *amoA* de AOA sin ser estadísticamente diferente de los demás tratamientos incluidos suelo desnudo y soya (Figura 29). Inesperadamente se observó una gran cantidad de copias del gen en el suelo de *B. humidicola* 679 la cual fue muy similar a la observada en



soya y suelo desnudo. Al igual que en la época de muestreo anterior, las variables topográficas del suelo pudieron influir la tendencia obtenida. Esta asunción se apoya con los resultados químicos (medición de nitritos y nitratos del suelo) obtenidos para este muestreo los cuales mostraron el mismo comportamiento (datos no presentados). Alternativamente, la pendiente leve del terreno en donde se estableció el experimento pudo contribuir al momento de realizar los riegos por gravedad en las parcelas lo cual permitió el lavado o movimiento de microorganismos de una parcela a otra. Por otra parte, la heterogeneidad espacial del suelo también pudo ser una limitante (Kirk *et al.*, 2004) que impidió medir con precisión el efecto de los exudados de las raíces de los cultivos en el número de genes *amoA* de AOA.

El porcentaje de AOA que representa la población total de archaeas fue el 4% para *B. humidicola* 16888 y 9% para *B. humidicola* 679 en comparación con el 6% y 8% para suelo desnudo y soya, respectivamente. Una vez más, el factor heterogeneidad del suelo y otras variables pudieron haber contribuido en la alteración de las proporciones esperadas en respuesta a los exudados de raíces de los pastos evaluados (Figura 29).



**Figura 29.** Influencia de pastos tropicales cultivados (en parcelas por más de tres años: Septiembre de 2004 a Noviembre de 2007) en la población de archaeas amonia-oxidantes (AOA) del suelo en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento a 30 días después de la fertilización al estimar el número de copias del gen *amoA* de AOA través de PCR en Tiempo-Real. Los datos se expresaron en número de copias del gen por g de suelo seco. Los valores mostrados son medias con sus respectivas desviaciones estándar calculadas a partir de tres repeticiones. Barras con letras distintas son estadísticamente diferentes ( $P \leq 0.05$ ).

En síntesis, los resultados obtenidos evidencian que *Brachiaria humidicola* en particular posee la capacidad de inhibir la nitrificación a través de la liberación de los exudados de sus raíces. Los pastos de *B. humidicola* los cuales están muy bien adaptados a los ambientes de producción bajos en nitrógeno de las sabanas sudamericanas (Rao *et al.*, 1996) mostraron la actividad BNI más alta. Por el contrario, *P. maximum*, el cual está adaptado a sistemas de producción intensivos que requieren la entrada de cantidades substanciales de insumos (Rao *et al.*, 1996) mostró la actividad BNI más baja de los pastos evaluados.

La inhibición de la nitrificación probablemente hace parte de los mecanismos de adaptación para conservar y usar el N de forma eficiente en algunos de los sistemas naturales donde el N es el factor limitante principal del crecimiento y reproducción (Subbarao *et al.*, 2006a). Así, el estrés por N podría ser la fuerza dominante que impulsa a la inhibición biológica de la nitrificación (BNI) como un mecanismo adaptativo (Rice y Pancholy, 1972; Lata *et al.*, 2004).

## 8. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- En este estudio se determinó el efecto de los exudados de las raíces de genotipos de *Brachiaria humidicola* en el número de genes funcionales de los microorganismos amoníaco-oxidantes del suelo involucrados en el proceso de la nitrificación.
- Se implementó y estandarizó la metodología de la PCR en Tiempo-Real para determinar la actividad BNI en genotipos de *B. humidicola*. Esta metodología demostró ser la adecuada para la caracterización del fenómeno BNI en el suelo al mostrar una buena reproducibilidad, especificidad y eficiencia en la cuantificación de los genes de interés. Por consiguiente, la aplicación de esta metodología en la caracterización del fenómeno BNI en otras especies permitirá identificar la posible diversidad genética en términos de actividad BNI en dichas especies. Este hecho podría sentar las bases para desarrollar estudios de genómica funcional que permitan identificar los genes responsables de la característica BNI en cultivos de importancia agrícola y genética.
- Los datos moleculares (expresados en número de copias del gen de interés / g de suelo seco) confirmaron la ocurrencia del fenómeno BNI usando el pasto tropical *B. humidicola* como modelo de estudio. El número de copias de los genes *amoA* de AOB y AOA del suelo en las parcelas del genotipo *B. humidicola* CIAT 16888 fue menor en la mayoría de las épocas de muestreo en comparación con los controles (soya y suelo desnudo) y los demás pastos

tropicales. Este hallazgo confirma que *B. humidicola* 16888 posee una alta capacidad de inhibir la acción amonio- oxidante de las AOB y AOA lo cual evidencia una alta actividad BNI para este genotipo al compararlo con los demás pastos tropicales analizados y los controles.

- La aplicación de sulfato de amonio al suelo tuvo un único efecto en el notable incremento del número de genes *amoA* de AOA y SSU rRNA de archaea tal como se observó en el 5<sup>to</sup> ciclo de crecimiento de los cultivos a un día después de la fertilización. Esto se debe a la mayor abundancia de poblaciones AOA en comparación con poblaciones de AOB. No obstante, la tendencia de la actividad BNI por parte de los genotipos de *B. humidicola* se mantuvo estable a pesar de la aplicación de fertilizante y el incremento de los genes *amoA* de AOA. Esto nos permite concluir que la aplicación del sulfato de amonio estimula y mantiene la actividad BNI de *B. humidicola*.
- El efecto acumulativo de los exudados de las raíces de *Brachiaria* sp. en el tiempo se observó en todas las épocas de muestreo. A pesar de las variaciones en el número de genes de bacterias y archaeas del suelo inducidas por la aplicación de sulfato de amonio, la tendencia de actividad BNI en los tratamientos evaluados se mantuvo constante observándose la mayor actividad BNI en *B. humidicola* en comparación con los otros pastos y controles (suelo desnudo y soya).

- Se sugiere realizar un estudio de cuantificación de genes de AOB y AOA como indicadores para determinar los parámetros ambientales del suelo que afectan la actividad BNI en *B. humidicola*. Tales parámetros podrían incluir pero no limitarse a pH, fuente de nitrógeno, tipo de suelo, entre otros.
- Puesto que ya se ha reportado que las AOA son numéricamente mucho más abundantes que las AOB en ecosistemas terrestres se recomienda hacer un análisis de expresión génica para determinar si la actividad amonía-oxidante de las AOA es también superior a la de AOB. Este análisis permitirá asignar un mayor beneficio agrícola y ambiental a la actividad BNI de *Brachiaria* sp. la cual tiene la facultad de inhibir la acción amonía-oxidante de ambos grupos de microorganismos.
- Una vez identificados los genes que gobiernan la característica BNI, éstos pueden ser explotados en programas de fitomejoramiento ya sea del género *Brachiaria* o de otras especies vegetales.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Addiscott, T. M. 2000. Tillage, mineralization and leaching. *Soil Tillage Res.* 53: 163–165.

Adriano, D. C., Pratt, P. F., and Takatori, F. H. 1972. Nitrate in unsaturated zone of an alluvial soil in relation to fertilizer nitrogen rate and irrigation level. *J. Environ. Qual.* 1: 418–422.

Amberger, A. 1993. Efficient management of nitrogen fertilization in modern cropping systems. *In: Optimization of Plant Nutrition.* Fragoso, M. A. C., and van Beusichem, M. L., Eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Baath, E., Lohm, U., Lundgren, B., Rosswall, T., Soderstrom, B., Sohlenius, B., and Wiren, A. 1978. The effect of nitrogen and carbon supply on the development of soil organism populations and pine seedlings: a microcosm experiment. *Oikos* 31: 153–163.

Baber, H. T., and Wilson, A. T. 1972. Nitrate pollution of groundwater in the Waikato region. *J. N. Z. Inst. Chem.* 56: 179–183.

Barker, A. V., and Mills, H. A. 1980. Ammonium and nitrate nutrition of horticultural crops. *Hort. Rev.* 2: 395–423.

Basu, P., Katterle, B., Anderson, K. K., and Dalton, H. 2003. The membrane-associated form of methane mono-oxygenase from *Methylococcus capsulatus* (Bath) is a copper/iron protein. *Biochem J* 369:417–427.

Bellamy, P. H., Loveland, P. J., Ian Bradley, R., Murray Lark, R., and Kirk, G. J. D. 2005. Carbon losses from all soils across England and Wales 1978–2003. *Nature* 437: 245–248.

Belser, L. W., 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 33: 309–333.

Belser, L. W. y Mays, E. L. 1980. Specific Inhibition of Nitrite Oxidation by Chlorate and Its Use in Assessing Nitrification in Soils and Sediments. *Applied and Environmental Microbiology.* 39: 505-510.

Bock, E., Koops, H. P., Harms, H., and Ahlers, B. 1991. The biochemistry of nitrifying organisms. *In: Shively, J. M., and Barton, L. L. (eds). Variations in autotrophic life.* Academic Press, San diego, CA, pp 171–200.

Bogdan, A. V. 1977. Tropical pasture and fodder plants (Grasses and legumes). Tropical Agriculture Series. Longman Inc. N. York. pp. 57-58.

Borneman, J., Skroch, P.W., O'Sullivan, K.M., Palus, J.A., Rumjanek, N.G., Jansen, J.L., Nienhuis, J., Triplett, E.W., 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1935–1943.

Bremner, J. M., and Blackmer, A. M. 1978. Nitrous oxide: emission from soil during nitrification of fertilizer nitrogen. *Science* 199: 295–296.

Burns, I. G. 1977. Nitrate movement in soil and its agricultural significance. *Outlook Agric.* 9: 144–148.

Campbell, C. A., Myers, R. J. K., and Curtin, D. 1995. Managing nitrogen for sustainable crop production. *Fert. Res.* 42: 277–296.

Cassman, K., Dobermann, A., and Walters, D. Agroecosystems, Nitrogen-use Efficiency, and Nitrogen Management. 2002. *Ambio.* 31:132-140.

Castilla, C., y Jackson, W. A. 1991. Nitrogen uptake mechanism in two *Brachiaria* species: Y-315. In: TropSoils technical report, 1988-1989. TropSoils, Raleigh, NC, USA. P. 164-167.

Clark, F. E., Beard, W. E., and Smith, D. H. 1960. Dissimilar nitrifying capacities of soils in relation to losses of applied nitrogen. *Proc. Soil Sci. Soc. Am.* 24: 50–54.

Crutzen, P. J., and Ehhalt, D. H. 1977. Effects of nitrogen fertilizers and combustion on the stratospheric ozone layer. *Ambio.* 6: 112–116.

Crutzen, P. J. 1981. Atmospheric chemical processes of the oxides of nitrogen, including nitrous oxide. In: *Denitrification, Nitrification and Atmospheric Nitrous Oxide*, pp. 17–44. Delwiche, C. C., Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York.

Chikowo, R., Mapfumo, P., Nyamugafata, P., and Giller, K.E. 2004. Mineral N dynamics, leaching and nitrous oxide losses under corn following two-year improved fallows on a sandy loam soil in Zimbabwe. *Plant Soil* 259: 315–330.

De Boer, W., and Kowalchuk, G. A. 2001. Nitrification in acid soils: microorganisms and mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 33: 853–866.

DeLong, E. F. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* Vol. 89, pp. 5685-5689.

Dinnes, D. L., Karlen, D. L., Jaynes, D. B., Kaspar, T. C., Hatfield, J. L., Colvin, T. S., and Cambardella, C. A. 2002. Nitrogen management strategies to reduce nitrate leaching in tile drained midwestern soils. *Agron. J.* 94: 153–171.

Fillery, I. R. P. 2007. Plant-based manipulation of nitrification in soil: a new approach to managing N loss? *Plant Soil* (2007) 294:1–4.



Ford, D. L., R. L. Churchwell, and R. L. Kachtick. 1980. Comprehensive analysis of nitrification of chemical processing wastewaters. *J. Water Pollut. Control Fed.* 52:2726–2745.

Franklin, R.B., Mills, A.L., 2003. Multi-scale variation in spatial heterogeneity for microbial community structure in an eastern Virginia agricultural field. *FEMS Microb. Ecol.* 44: 335–346.

Giles, J. 2005. Nitrogen study fertilizes fears of pollution. *Nature* 433:791.

Giller, K.E., Beare, M.H., Lavelle, P., Izac, A.-M.N., Swift, M.J., 1997. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. *Appl. Soil Ecol.* 6, 3 –16.

Glass, A. 2003. Nitrogen Use Efficiency of Crop Plants: Physiological Constraints upon Nitrogen Absorption. *Critical Review in Plant Sciences.* 22:453-470.

Goss, M. J., Colbourn, P., Harris, G. L., and Howse, K. R. 1988. Leaching of nitrogen under autumn-sown crops and effects of tillage. In: *Nitrogen Efficiency in Agricultural Soils*. pp. 269–282. Jenkenson, D. S. and Smith, K. A., Eds., Elsevier, Chichester.

Grant, C. A., Jia, S., Brown, K. R., and Baily, D. 1996. Volatile losses of NH<sub>3</sub> from surface-applied urea and urea ammonium nitrate with and without the urease inhibitors NBPT or ammonium thiosulphate. *Can. J. Soil Sci.* 76: 417–419.

Gulliam, J.W., Logan, T. J., and Broadbent, F. E. 1985. Fertilizer use in relation to the environment. In: *Fertilizer Technology and Use* (3rd ed.), pp. 561–588. Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.

Haynes, R. J., and Goh, K. M. 1978. Ammonium and nitrate nutrition of plants. *Biol. Rev.* 53: 465–510.

Herrmann, M., Pust, J., and Pott, R. 2005. Leaching of nitrate and ammonium in heathland and forest ecosystems in Northwest Germany under the influence of enhanced nitrogen deposition. *Plant Soil*, 273: 129–137.

Hermansson, A., y Lindgren, P-E. 2000. Quantification of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Arable Soil by Real-Time PCR. *Applied and Environmental Microbiology.* 67: 972-976.

Hiorns, W. D., R. C. Hastings, I. M. Head, A. J. McCarthy, R. Saunders, R. W. Pickup, and H. Hall. 1995. Amplification of 16S ribosomal RNA genes of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria demonstrates the ubiquity of nitrosospiras in the environment. *Microbiology* 141:2793–2800.

Holland, E., *et al.* 1999. *En* Standard Soil Methods for Long-Term Ecological Research. (Oxford University Press, UK), 185-201.

Hill, M. J., Hawksworth, G. and Tatterstall, G. 1973. Bacteria, nitrosamines and cancer of the stomach. *Br. J. Cancer* 28, 562–567.

IFA (International Fertilizer Association). 2005. *World Fertilizer Use*. IFA (Ed), Paris, France. 124 pp.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change). 2001. *Climate Change: The Scientific Basis. Third Assessment Report of the IPCC*. Houghton, J., Ding, Y., Griggs, D., Noguer, M., Van der Linden, P., Dai, X., Maskell, K., and Jonhson, C., Eds., Cambridge University Press, Cambridge, UK. 881 p.

Iizumi T, Nakamura, K. 1997. Cloning, nucleotide sequence, and regulatory analysis of the *Nitrosomonas europaea* dnaK gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1777–1784.

Iizumi T, Mizumoto M, Nakamura, K. 1998. A bioluminescence assay using *Nitrosomonas europaea* for rapid and sensitive detection of nitrification inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3656–3662.

Jarvis, S. C. 1996. Future trends in nitrogen research. *Plant Soil* 181: 47–56.

Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., and Trevors, J. T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*. 58: 169-188.

Keeney, D. R. 1980. Prediction of soil nitrogen availability in forest ecosystems: a literature review. *Forest Sci.* 26: 159–171.

Kowalchuk, G. A., and Stephen, J. R. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: A model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 485–529.

Kroeze, C. 1994. Nitrous oxide and global warming. *Sci. Total Environ.* 143: 193–209.

Lata, J. C., Degrange, V., Raynaud, X., Maron, P. A., Lensi, R., and Abbadie, L. 2004. Grass population control nitrification in savanna soils. *Fun. Ecol.* 18: 605–611.

Leininger, S., Urich, T., Schlöter, M., Schwark, L., Qi, J., Nicol, G. W., Prosser, J. I., Schuster, S. C., and Schleper, C. 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature*, Vol. 442:806-809.

Liljeroth, E., Van Veen, J. A., and Miller, H. J. 1990. Assimilate translocation to the rhizosphere of two wheat lines and subsequent utilization by rhizosphere

microorganisms at two soil nitrogen concentrations. *Soil Biol. Biochem.* 22: 1015–1021.

Lodhi, M. A. K. 1982. Additional evidence of inhibition of nitrifiers and possible cycling of inhibitors produced by selected plants in a climax community. *Bull Torrey Bot Club* 109:199–204.

McKane, R. B., Johnson, L. C., Shaver, G. R., Nadelhoffer, K. J., Rastetter, E. B., Fry, B., Giblin, A. E., Kielland, K., Kwiatowski, B. L., Laundre, J. A., and Murray, G. 2002. Resource-based niches provide a basis for plant species diversity and dominance in arctic tundra. *Nature* 415: 68–71.

Mason, M. G. 1992. Effect of nitrogen source and soil type on inorganic nitrogen concentrations and availability in field trials with wheat. *Aust. J. Exp. Agric.* 32: 175–181.

Matulewich, V. A., P. F. Strom, and M. S. Finstein. 1975. Length of incubation for enumerating nitrifying bacteria present in various environments. *Appl. Microbiol.* 29:256–268.

McGill, W. B., Campbell, C. A., Dormaar, J. F., Paul, E. A., and Anderson, D.W. 1981. Soil organic matter loss. In: *Agriculture Land: Our Disappearing Heritage*. pp. 72–133. Proc. Annu. Alberta Soil Sci. Workshop, Edmonton. 24–25 Feb. 1981. Alberta Soil and Feed Testing Lab., Edmonton.

Mengel, K., and Kirkby, E. A. 1978. *Principles of Plant Nutrition*. International Potash Institute, Horgen.

Miles, J.W.; Maass, B.L. and do Valle, C.B. (eds). 1996. *Brachiaria: Biology, Agronomy and Improvement*. Joint publication by CIAT, Cali, Colombia and Embrapa/CNPQC, Campo Grande, MS, Brazil. p. 312.

Montagnini, F., Haines, B., and Swank, W. 1989. Factors controlling nitrification in soils of early successional and oak/hickory forest in the southern Appalachians. *Forest Ecol. Manage.* 26: 77–94.

Mosier, A. R. 1993. *Nitrous Oxide Emissions from Agricultural Soils. Methane and Nitrous Oxide: Methods in National Emissions Inventories and Options for Control*. Proceedings of the International IPCC Workshop. National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven.

Mosier, A. R., Duxbury, J. M., Freney, J. R., Heinemeyer, O., and Minami, K. 1996. Nitrous oxide emissions from agricultural fields: Assessment, measurement, and mitigation. *Plant Soil* 181: 95–108.

Muyzer, G., Smalla, K., 1999. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 127– 141.

Newbould, P. 1989. The use of nitrogen fertilizer in agriculture. Where do we go practically and ecologically? *Plant Soil*, 115: 297–311.

Norton, J. M., Alzerreca, J. J., Suwa, Y., and Klotz, M. G. 2002. Diversity of ammonia monooxygenase operon in autotrophic ammonia oxidizing bacteria. *Arch. Microbiol.* 177: 139–149.

NRC (National Research Council). 1972. *Accumulation of Nitrate*. Natl. Acad. Sci. Washington, D.C.

Okano, Y., Krassimira, R., Hristova, R., Leutenegger, C. M., Jackson, L. E., Ford Denison, R., Gebreyesus, B., Lebauer, D., and Scow, K. M. 2004. Application of Real-Time PCR To Study Effects of Ammonium on Population Size of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 70: 1008-1016.

Ovreas, L., Jensen, S., Daae, F.L., Torsvik, V., 1998. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2739– 2742.

Pace, N.R., 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276, 734– 740.

Parmelee, R. W., Ehrenfeld, J. G., and Tate, R. L. 1993. Effects of pine roots on microorganisms, fauna, and nitrogen availability in two soil horizons of a coniferous forest spodosol. *Biol. Fert. Soils* 15: 113–119.

Peng, S. B., Buresh, R. J., Huang, J. L., Yang, J. C., Zou, Y. B., Zhong, X. H., and Wang, G. H. 2005. Over-application of nitrogen fertilizer in intensive rice system in China. In: *Plant Nutrition for Food and Security, Human Health and Environment Protection*. XVIPNC 2005, Beijing, China, pp. 62–63. Li, C. J., Zhang, F. S., Dobermann, A., Lambers, H., Li, X. L., Marschner, P., Maene, L., McGrath, S., Oenema, O., Peng, S. B., Rengel, Z., Shen, Q. R., Welch, R., von Wiren, N., Yan, X. L., and Zhu, Y. G., Eds., Tsinghua University Press, Beijing.

Powlson, S. 1993. Understanding the soil nitrogen cycle. *Soil Use Manage.* 9: 86–94.

Pratt, P. F., and Adriano, D. C. 1973. Nitrate concentrations in the unsaturated zone beneath irrigated fields in southern California. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 37: 321–322.

Prosser, J. I. 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microbial Physiol.* 30: 125–181.

Rabalais, N. N., Wiseman, W. J., Turner, R.E., Sen Gupta, B. K., and Dortch, Q. 1996. Nutrient changes in the Mississippi river and system responses on the adjacent continental shelf. *Estuaries* 19: 386–407.

Rao, I. M., Kerridge, P. C., Macedo, M. 1996. Adaptation to low fertility acid soils and nutritional requirements of *Brachiaria*. In: Miles, J. W., Maass, B. L., do Valle, C. B. (eds). The biology, agronomy and improvement of *Brachiaria*. CIAT, Cali, Colombia, pp 53–71.

Raun, W. R., and Johnson, G. V. 1999. Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agron J* 91:357–363.

Raun, W. R. Solie, J. B., Johnson, G. V., Stone, M. L., Mullen, R. W., Freeman, K. W., Thomason, W. E., and Lukina, E. V. 2002. Improving Nitrogen Use Efficiency in Cereal Grain Production with Optical Sensing and Variable Rate Application. *Agron. J.* 94:815–820.

Rice, C. W., and Pancholy, S. K. 1972. Inhibition of nitrification by climax ecosystem. *Am. J. Bot.* 59: 1033–1040.

Rivas, L. y Holmann, F. 2004. Impacto económico potencial de nuevos híbridos de *Brachiaria* resistentes a salivazo en los Llanos orientales y Costa norte de Colombia. *Publicación CIAT No. 199*. CIAT, Cali, Colombia

Robinson, J. B. 1963. Nitrification in a New Zealand grassland soil. *Plant Soil* 14:173–183.

Rondón, M., Hurtado, M. P., Rao, I. M., Ishitani, M., Miles, J. W., Lascano, C. E., Subbarao G. V., Ishikawa, T. and Ito, O. 2006. Screening for genetic variability in the ability to inhibit nitrification in accessions of *Brachiaria humidicola*. In: CIAT, 2007. Annual report 2006. Project IP-5. Tropical Grasses and Legumes: Optimizing genetic diversity for multipurpose use. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 230 p.

Rotthauwe, J. H., Witzel, K. P., and Liesack, W. 1997. The Ammonia Monooxygenase Structural Gene *amoA* as a Functional Marker: Molecular Fine Scale Analysis of Natural Ammonia-Oxidizing Populations. *Applied and Environmental Microbiology* 63:4704-4712.

Sahrawat, K. L. 1980a. Nitrification in some tropical soils. *Plant Soil* 65: 281–286.

Sahrawat, K. L. 1989. Effects of nitrification inhibitors on nitrogen transformations, other than nitrification, in soils. *Adv. Agron.* 42: 279–309.

Salsac, L., Chaillou, S., Morot-Gaudry, J., and Lesaint, C. 1987. Nitrate and ammonium nutrition in plants. *Plant Physiol. Biochem.* 25: 805–812.

Schepers, J. S., Moravek, M. G., Alberts, E. E., and Frank, K. D. 1991. Maize production impacts on groundwater quality. *J. Environ. Qual.* 20: 12–16.

Schroder, J. J., ten Holte, L., van Keulen, H., and Steenvoorden. 1993. Effects of nitrification inhibitors and time and rate of slurry and fertilizer N application on silage maize yield and losses to the environment. *Fert. Res.* 34: 267–277.

Shuval, H. I., and Gruener, N. 1972. Epidemiological and toxicological aspects of nitrates and nitrites in the environment. *Am. J. Publ. Health* 62: 1045–1052.

Slangen, J., and Kerkhoff, P. 1984. Nitrification inhibitors in agriculture and horticulture: A literature review. *Fert. Res.* 5: 1–76.

Smart, D. R., and Bloom, A. J. 2001. Wheat leaves emit nitrous oxide during nitrate assimilation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98: 7875–7878.

Smith, K. A., McTaggart, I. P., and Tsuruta, H. 1997. Emissions of N<sub>2</sub>O and NO associated with nitrogen fertilization in intensive agriculture, and the potential for mitigation. *Soil Use Manage.* 13: 296–304.

Sommer, K., Mertz, M., and Rossig, K. 1976. Stickstoff zu weizen mit ammonium-nitrificiden. mitteilung 2: Proteingehalte, proteinfraktionen und backfahigkeit. *Landw. Forschung* 29: 161–169.

Stephen, J. R., A. E. McCaig, Z. Smith, J. I. Prosser, and T. M. Embley. 1996. Molecular diversity of soil and marine 16S rRNA gene sequences related to b-subgroup ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:4147–4154.

Strong, W. M., y Cooper, J. E. 1992. Application of anhydrous ammonia or urea during the fallow period for winter cereals on the Darling Downs, Queensland. I. Effect of time of application on soil mineral N at sowing. *Aust. J. Soil Res.* 30: 695–709.

Subbarao, G. V., Ito, O., Sahrawat, K. L., Berry, W. L., Nakahara, K., Ishikawa, T., Watanabe, T., Suenaga, K., Rondón, M., and Rao, I. M. 2006a. Scope and Strategies for Regulation of Nitrification In Agricultural Systems-Challenges and Opportunities. *Critical reviews in Plant Sciences*, 25:303-335.

Subbarao, G. V., Ishikawa, T., Ito, O., Nakahara, K., Wang, H. Y., and Berry, W. L. 2006b. A bioluminescence assay to detect nitrification inhibitors released from plant roots: a case study with *Brachiaria humidicola*. *Plant Soil* 288:101-112.

Subbarao G. V., Rondón, M., Rao, I. M., Ishikawa, T., Ito, O., Hurtado, M. P., Amézquita, E. Barrios, E., and Lascano, C. 2006c. Field Validation of the Phenomenon of Nitrification Inhibition by *Brachiaria humidicola* and Other Tropical Grasses. *In: Suenaga, K., Kudo, H., and Oshio, S. (eds).*

Comprehensive Studies on the Development of Sustainable Soybean Production Technology in South America. JIRCAS. Working Report, 51:107-112.

Subbarao G. V., Rondón, M., Ito, I., Ishikawa, T., Rao, I. M., Nakahara, K., Lascano, C., and Berry, W. L. 2007a. Biological nitrification inhibition (BNI) – is it a widespread phenomenon? *Plant soil* 294:5-18.

Subbarao G. V., Wang, H. Y., Ito, O., Nakahara, K., and Berry, W. L. 2007b.  $\text{NH}_4^+$  triggers the synthesis and release of biological nitrification inhibition compounds in *Brachiaria humidicola* roots. *Plant Soil* 290: 245-257.

Subbarao, G. V., Nakahara, K., Hurtado, M. P., Ono, H., Moreta, D. E., Salcedo, A. F., Yoshiashi, A. T., Ishikawa, T., Ishitani, M., Ohnishi-Kameyama, M., Yoshida, M., Rondón, M., Rao, I. M., Lascano, C. E., Berry, W. L., and Ito, O. 2009. Evidence for biological nitrification inhibition in *Brachiaria* pastures. *PNAS* 106: 17302-17307.

Suzuki, I., Dular, U., and Kwok, S. C. 1974. Ammonia and ammonium ion as substrate for oxidation by *Nitrosomonas* cells and extracts. *J. Bacteriol.* 176: 6623–6630.

Suzuki, M., Lance, T., and DELong, E. 2000. Quantitative Analysis of Small-Subunit rRNA Genes in Mixed Microbial Populations via 5'-Nuclease Assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4605-4614.

Sylvester-Bradley R., Mosquera D., and Mendez J.E. 1988. Inhibition of nitrate accumulation in tropical grass-land soils: Effect of nitrogen fertilization and soil disturbance. *J. Soil Sci.* 39:407–416.

Tabacchioni, S., Chiarini, L., Bevivino, A., Cantale, C., Dalmastri, C., 2000. Bias caused by using different isolation media for assessing the genetic diversity of a natural microbial population. *Microb. Ecol.* 40, 169– 176.

Tergas, 1991. El potencial de *Brachiaria humidicola* para suelos ácidos e infértiles en América Tropical. *Pastos Tropicales Bol. Inf. No.4.* CIAT. Cali, Colombia.

Tiedje, J.M., Asuming-Brempong, S., Nusslein, K., Marsh, T.L., Flynn, S.J., 1999. Opening the black box of soil microbial diversity. *Appl. Soil Ecol.* 13: 109–122.

Timmons, D. R., and Baker, J. L. 1991. Recovery of point-injected labeled nitrogen by corn as affected by timing, rate and tillage. *Agron. J.* 83: 850–857.

Torsvik, V., Daae, F.L., Sandaa, R.-A., Ovreas, L., 1998. Review article: novel techniques for analysing microbial diversity in natural and perturbed environments. *J. Biotechnol.* 64, 53–62.

Treusch, A. H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S. C., Klenk, H. P., and Schleper C. 2005. Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environmental Microbiology* 7: 1985-1995.

Trevors, J. T. 1998. Bacterial biodiversity in soil with an emphasis on chemically-contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.* 101: 45-67.

VanVeen, J. A., Merckx, R., and Van de Gejn, S. C. 1989. Plant- and soil-related controls of the flow of carbon from roots through the soil microbial biomass. *Plant Soil* 115: 179–188.

Viets, F. G. 1975. The environmental impact of fertilizers. *CRC Critic. Rev. Environ. Con.* 5: 423–453.

Vitousek, P. M., Gosz, J. R., Grier, C. C., Melillo, J. M., and Reiners, W. A. 1982. A comparative analysis of potential nitrification and nitrate mobility in forest ecosystems. *Ecol. Monogr.* 52: 155–177.

Vitousek, P. M., Aber, J., Howarth, R.W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W., Schlesinger, W. H., and Tilman, D. G. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecol. Appl.* 7: 737–750.

Vitousek, P. M., Hattenschwiler, S., Olander, L., and Allison, S. 2002. Nitrogen and nature. *Ambio* 31: 97–101.

Watson, S. W., E. Bock, H. Harms, H. P. Koops, and A. B. Hooper. 1989. Nitrifying bacteria, p. 1808–1834. In J. T. Staley, M. P. Bryant, N. Pfennig, and J. G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. 3. Williams and Wilkins, Baltimore, Md.

Wedin, D. A., and Tilman, D. 1990. Species effects on nitrogen cycling: a test with perennial grasses. *Oecologia* 84: 433–441.

Weisenburger, D. D., in *Nitrate Contamination: Exposure Consequences and Control* (eds Bogorad, I. and Kuzerka, R. D.), NATO ASI Series G: Ecological Sciences 30, Springer Verlag, Berlin, 1991, pp. 309–331.

White, C. S. 1988. Nitrification inhibition by monoterpenoids: theoretical mode of action based on molecular structures. *Ecology* 69:1631–1633.

White, C. S. 1991. The role of monoterpenes in soil nitrogen cycling in ponderosa pine. *Biogeochemistry* 12:43–68.



Woldendorp, J. W., and Laanbroek, H. J. 1989. Activity of nitrifiers in relation to nitrogen nutrition of plants in natural ecosystems. *Plant Soil* 115:217–228.